

Universität Duisburg-Essen  
Fakultät für Ingenieurwissenschaften  
Lehrstuhl für Massivbau

## **Abbau und Effekt ausgewählter anthropogener Stoffe im Biogasprozess**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades (Dr.-Ing.)

vorgelegt von Matthias Balsam

geboren am 03.06.1984 in Essen

Erstgutachter: Prof. Dr. Martin Denecke, Universität Duisburg-Essen

Zweitgutachter: Prof. Dr. Axel Griesbeck, Universität zu Köln

Tag der mündlichen Prüfung 11. Januar 2018



## Danksagung

Die vergangenen Jahre, an denen ich mich innerhalb der Technischen Hochschule Köln und dem Forschungsinstitut STEPs meiner Dissertation widmen konnte, haben mich nachhaltig geprägt. Hier möchte Ich mich bei allen Personen bedanken, die mich auf diesem Weg begleitet und unterstützt haben.

Mein größter Dank gebührt **Frau Prof. Dr. Astrid Rehorek** (TH-Köln), ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Der wissenschaftliche Austausch sowie Ihre Motivierungen haben maßgeblich zu dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Darüber hinaus bedanke ich mich für das von Ihr entgegengebrachte Vertrauen in meine Arbeit und in meine Person.

Bei Herrn Prof. Dr. Denecke von der Universität Duisburg-Essen, welcher die universitäre Betreuung übernommen hat, bedanke ich mich für seine kompetenten Anmerkungen und seine Unterstützung bei dieser Arbeit. Danke auch an Herrn Prof. Dr. Griesbeck von der Universität zu Köln für die universitäre Zweitbetreuung.

Ein großer Dank gilt allen meinen Kollegen, die mir innerhalb der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rehorek und dem Pra & Pat Center geholfen haben. Besonders hervorzuheben sind hierbei Dr. Benjamin Frindt, Christoph Steiner, Karl Mocha, Nitesh Babu und Thomas Millenautzki, mit denen ich sowohl das Büro, als auch den Arbeitsalltag geteilt habe. Ohne den Zusammenhalt und die Unterstützung wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen. Bei Prof. Dr. Stephan Barbe und Prof. Dr. Jörn Stitz bedanke ich mich, da sie auch abseits meines Dissertationsthemas immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Bei Katja Falkenberg und Claudia Sobetzko bedanke ich mich für das Korrekturlesen.

Benjamin Ehrlein und Michael Zier, von der Firma Sofotec GmbH, möchte ich, sowohl für die Ermutigung diesen Schritt der Promotion zu gehen, aber auch bei der Vermittlung von weiterem analytischen Equipment danken.

Bei meinen Eltern, Brigitte und Hans Theo Balsam, bedanke ich mich für die Unterstützung, die Ermutigung, Geduld und Zeit, welche sie mir schon immer entgegengebracht haben.

Meiner Frau Eva danke ich für alles was sie in den letzten Jahren für mich gemacht hat und wo sie für mich zurück stecken musste.

Hürth, August 2017

Matthias Balsam

## Kurzzusammenfassung (deutsch)

Die Erzeugung von Biogas aus nachwachsenden Rohstoffen und organischen Reststoffen wird auch in Zukunft in Deutschland zum Erreichen der Ziele der Energiewende eine wichtige Rolle spielen. Eine optimale Prozess-Führung, -Kontrolle und -Kenntnis ist dabei unerlässlich, um den Biogasprozess so effektiv wie möglich zu gestalten. Gängige Substrate wie Mais und Gülle führen immer häufiger anthropogene Verunreinigung wie Pestizide, Antibiotika und veterinäre Desinfektionsmittel mit sich. Es muss daher sichergestellt sein, dass diese anthropogenen Stoffe weder eine Belastung für die mikrobiologischen Prozesse darstellen noch eine Gefährdung von diesen für Mensch und Umwelt ausgehen.

In der vorliegenden Arbeit sollten Kenntnisse über den Einfluss von anthropogenen Stoffen auf den anaeroben Vergärungsprozess anhand von Laborversuchen erlangt werden. Als relevante anthropogene Stoffe wurden die aktiven Bestandteile von veterinären Desinfektionsmitteln, quaternären Ammoniumverbindungen, und das Pestizid Glyphosat getestet. Hierbei wurden neben der Betrachtung der Biogasproduktion anhand von Fettsäureprofilen die beeinflussten Gruppen von anaeroben Mikroorganismen ermittelt. Erweiternd zu vorangegangenen Studien sollte für die Gruppe der quaternären Ammoniumverbindungen getestet werden, ob Mischungen von mehreren Substanzen einen verstärkenden (synergistischen) Effekt aufweisen. Ferner wurden Abbau- und Adsorptionsversuche durchgeführt, um das Umweltverhalten dieser Stoffe zu simulieren. All dies erforderte sensitive, substanzspezifische Analysenverfahren aus biologischen Matrices, welche im Rahmen dieser Arbeit weiterentwickelt und validiert wurden.

Die Versuchsergebnisse zeigen, dass von Glyphosat und seinem Metaboliten Aminomethylphosphonsäure (AMPA) für den zu erwartenden Konzentrationsbereich keine Beeinflussung der mikrobiologischen Prozesse zur Biogaserzeugung ausgehen. Jedoch zeigten die quaternären Ammoniumverbindungen bereits bei deutlich geringeren Konzentrationen ( $1 \text{ bis } 5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) einen Einfluss auf die anaeroben Mikroorganismen. Außerdem konnten für diese Substanzen synergistische Effekte festgestellt werden ( $0,1 \text{ bis } 0,01 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Dies ist besonders kritisch, da quaternäre Ammoniumverbindungen in diesen Konzentrationsbereichen ( $0,01 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) bereits in Biogasanlagen nachgewiesen wurden. Ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeit ist, dass gezeigt wurde, dass die Hydrophilie der quaternären Ammoniumverbindungen über die Toxizität dieser Stoffe entscheidet, die mit steigender Membranlöslichkeit zur Zelllyse führen. Dies betraf vorwiegend die Archaeen. Ein Abbau dieser Substanzen konnte nicht festgestellt werden. Der hohe Eliminationsgrad der Substanzen wurde auf Adsorption zurückgeführt. Die Ergebnisse und die daraus gezogenen Schlüsse zum Einsatz von quaternären Ammoniumverbindungen können für Betreiber von Biogasanlagen als Verfahrensvorschläge verwendet werden.



## Abstract (english)

The production of biogas from renewable materials and organic waste will play an important role for the renewable energy sector in Germany. Optimal management, control and knowledge of the process are essential for an effective anaerobic digestion. An increasing level of feedstock contamination with pesticides, antibiotics and veterinary disinfectants was recently reported. Therefore, it is essential to ensure that these anthropogenic substances do not negatively impact microbiological processes and the environment.

In this work, laboratory tests were performed to detect the influence of anthropogenic substances on anaerobic digestion. Thus, active ingredients of veterinary disinfectants (quaternary ammonium compounds) and the pesticide glyphosate were tested as relevant anthropogenic substances. Apart from the study of biogas production, the fatty acid profiles were analyzed to evaluate which anaerobic microorganisms were influenced. In addition to previous studies, experiments should be included that test for synergistic effects of individual substances or mixtures of quaternary ammonium compounds. Furthermore, degradation and adsorption experiments were carried out to simulate the environmental behavior of these substances. All tests required sensitive, substance specific analytical methods from complex matrices, which were further developed and validated within this work.

The test results show that glyphosate and its metabolite aminomethylphosphonic acid do not influence the microbiological processes of biogas production in the expected concentration range. However, quaternary ammonium compounds affected the anaerobic microorganisms already at significantly lower concentrations (1 to 5 mmol·L<sup>-1</sup>). In addition, synergistic effects were observed for these substances (0.1 to 0.01 mmol·L<sup>-1</sup>). This is particularly critical, since quaternary ammonium compounds have already been detected in biogas plants in similar concentrations (0.01 mmol·L<sup>-1</sup>). An important result of this work is that the hydrophilicity of the quaternary ammonium compounds was determined as a reason for toxicity due to cell lysis with increasing membrane solubility. This mainly concerned the methanogenic archaea. The degradation of these substances could not be determined. The high elimination rate of these substances was attributed to adsorption on the sewage sludge. The results and the resulting conclusions for the use of quaternary ammonium compounds can be used as a procedural requirement for anaerobic digestions.

## Abkürzungsverzeichnis

AMPA	Amminomethylphosphonsäure
ATMA-C12	Dodecyltrimethylammonium
ATMA-C16	Hexadecyltrimethylammonium
ATMA-Cn	Monoalkyl-Ammonium-Ionen
BDMA-C12	Benzyl dimethyldodecylammonium
BDMA-C16	Benzyl dimethylhexadecylammonium
BDMA-Cn	Benzyl-Alkyl-Ammonium-Ionen
BG	Bestimmungsgrenze
BHKW	Blockheizkraftwerk
BSA	benzene sulfonic acid
CE	collision energie / Kollisionsenergie
CID	Collision induced dissociation
CoA	Coenzym-A
cps	counts per seconds
CRM	charge residue model
Da	Dalton
DAD	Dioden array detectors
DAD	Dioden-Array Detektor
DDMA-C10	Dimethyldidecylammonium
DDMA-Cn	Dialkyl-Ammonium-Ionen
dG	freie Enthalpie
DIN	Deutsches Institut für Normung
DüMV	Düngemittelverordnung
DVG	Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V.
EEG	Erneuerbare-Energie-Gesetz
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FOS	Flüchtige organische Säuren
FWD	fixed wavelength detectors / UV-Detektor
GC	Gaschromatographie
HPLC	high performance liquid chromatography / Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie
IC	Ionenchromatographie

IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
K	Verteilungskoeffizienten
LAS	linear alkylbenzene sulfonate
LOD	limit of detection / Nachweisgrenze
LOQ	limit of quantification / Bestimmungsgrenze
m/z	Masse / Ladung Verhältnis
MRM	multi reaktion modus
MS	Massenspektrometer
MS	Massenspektrometer
MW	Megawatt
n	Anzahl
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NG	Nachweisgrenze
NL	neutral loss / Neutralverlust
NSA	naphthalene sulfonic acid
oTS	organische Trockensubstanz
PAT	Prozessanalysetechnik
PRA	Prozessanalytik
QACs	quaternary ammonium compounds
Q	Quadrupole
QSAR	quantitative structure-activity relationship
R <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß
RI	reflection index detector / Lichtbrechungsdetektor
RP	reversed phase / Umkehrphase
S/N	signal to noise / Signal zu Rausch
SCFA	short chain fatty acids
SDS	sodium dodecylsulfonate
SF	Sektorfeld
TAC	Totaler anorganischer Kohlenstoff
TOF	time of flight
Trap	Ionenfalle
TS	Trockensubstanz
UV	Ultraviolettes Licht
Vis	Sichtbares Licht

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1-1 Strommix	1
Abbildung 2.1-1 GlyphosatAbbau	6
Abbildung 2.1-2 Umweltverteilung von Glyphosat	7
Abbildung 2.2-1 Struktur QACs	8
Abbildung 2.2-2 Produktübersicht von Desinfektionsmitteln	9
Abbildung 2.2-3 Wirkungsmechanismus von QACs	11
Abbildung 2.2-4 Abbaumechanismus QACs	12
Abbildung 2.2-5 $\omega$ -Oxidation:	12-13
Abbildung 2.2-6 $\beta$ -Oxidation	13-14
Abbildung 2.2-7 C-N Spaltung	14
Abbildung 2.3-1 Anaerober Abbau	19
Abbildung 2.3-2 Verfahrenskombinationen	20
Abbildung 2.3-3 Biogasanlage	21
Abbildung 2.3-4 FOS	24
Abbildung 2.4-1 Prozessanalytik:	25
Abbildung 2.4-2 HPLC Fließbild	26
Abbildung 2.4-3 Retentionsvorgang	27
Abbildung 2.4-4 HPLC-Peak	28
Abbildung 2.4-5 Van-Deemter-Diagramm	29
Abbildung 2.4-6 UV-Detektorzelle	31
Abbildung 2.4-7 MS/MS	33
Abbildung 2.4-8 IC-Fließbild	36
Abbildung 2.4-9 IC Größen Ausschluss Chromatographie	37
Abbildung 2.4-10 IC Suppressor	38
Abbildung 2.4-11 Dialyse Vorgang	39

Abbildung 2.6-1 Michaelis-Menten-Diagramm	43
Abbildung 2.6-4 $K_{\text{relativ}}$ Bestimmung	45
Abbildung 3.1-1 Labor-Biogasreaktor	47
Abbildung 3.1-2 Aerober Technikums -Biogasreaktor	50
Abbildung 3.1-3 Anaerober Biogasreaktor mit online Dialyse-IC:	55
Abbildung 3.5-1 LC-MS/MS Chromatogramm	57
Abbildung 3.5-2 LC-MS/MS Probenaufarbeitung	58
Abbildung 4.1-1 IC Selektivität	62
Abbildung 4.1-2 IC-Linearität:	66
Abbildung 4.1-3 IC-Linearität	66
Abbildung 4.1-4 IC-Robustheit	69
Abbildung 4.2-1 Massenspektren ATMA-C12/16	71
Abbildung 4.2-2 Fragmentierung ATMA-C12/16	71
Abbildung 4.2-3 Massenspektren BMA-C12/16	72
Abbildung 5.2-4 Fragmentierung BMA-C12/16	72
Abbildung 4.2-5 Strukturformel ITSD	73
Abbildung 4.2-6 Massenspektrum DDMA-C10	74
Abbildung 4.2-7 Fragmentierung DDMA-C10:	74
Abbildung 4.2-8 LC-MS/MS Chromatogramm	76
Abbildung 4.2-9 Extracted ion chromatogram	77
Abbildung 4.2-10 MRM-Chromatogramm und EMS-Chromatogramm	78
Abbildung 4.2-11 Linearearbeitsbereich	80
Abbildung 4.2-12 Linearität	81
Abbildung 4.3-1 Onlinedialyse	84
Abbildung 4.3-2 Onlinedialyse	85
Abbildung 4.3-3 Onlinedialyse	86

Abbildung 4.4-1 Glyphosat Screening	88
Abbildung 4.4-2 Glyphosat Screening	89
Abbildung 4.4-3 Glyphosat Fettsäureprofil	89
Abbildung 4.4-4 Glyphosat	91
Abbildung 4.4-5 Glyphosat Fettsäure	91
Abbildung 4.4-6 AMPA	93
Abbildung 4.4-7 AMPA Fettsäureprofil	93
Abbildung 4.5-1 BDMA-C12	97
Abbildung 4.5-2 BDMA-C12 Fettsäureprofil:	97
Abbildung 4.5-3 BDMA-C16	99
Abbildung 4.5-4 BDMA-C16 Fettsäureprofil	99
Abbildung 4.5-5 ATMA-C12	102
Abbildung 4.5-6 ATMA-C12 Fettsäureprofil	102
Abbildung 4.5-7 ATMA-C16	103
Abbildung 4.5-8 ATMA-C16 Fettsäureprofil	103
Abbildung 4.5-9 DDMA-C10	104
Abbildung 4.5-10 DDMA-C10 Fettsäureprofile	105
Abbildung 4.5-11 BDMA-C12 und BDMA-C16 Mix	106
Abbildung 4.5-12 BDMA-C12 und BDMA-C16 Fettsäureprofil	107
Abbildung 4.5-13 ATMA-C12 und ATMA-C16	107
Abbildung 4.5-14 BDMA-C12, BDMA-C16 und DDMA-C10	109
Abbildung 4.5-15 BDMA-C12, BDMA-C16 und DDMA-C10 Fettsäureprofile	109
Abbildung 4.5-16 Struktur/Wirkung	111
Abbildung 4.5-17 Interaktion	112
Abbildung 4.5-18 Anfangsphase	112

Abbildung 4.5-19 Anaerober Abbau	114
Abbildung 4.5-20 Anaerober Abbau	115
Abbildung 4.5-21 Adsorption Mikrobewuchskörpern	117
Abbildung 4.5-22 Adsorption Schlamm	117

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.2-1 Abkürzung QACs	8
Tabelle 2.2-2 QACs	17
Tabelle 2.3-1 FOS	24
Tabelle 3.1-1 Eudiometer Versuche	49
Tabelle 3.1-2 IC-Parameter	52
Tabelle 3.5-1 HPLC-Methode	56
Tabelle 4.1-1 Selektivität	62
Tabelle 4.1-2 Selektivität in Matrix	63
Tabelle 4.1-3 LOD/LOQ	64
Tabelle 4.1-4 Linearität	64
Tabelle 4.1-5 Standards Linearität	65
Tabelle 4.1-6 Richtigkeit	67
Tabelle 4.1-7 Präzision	67
Tabelle 4.1-8 Robustheit	68
Tabelle 4.2-1 MRM-Methode	75
Tabelle 4.2-2 HPLC-Methode	75
Tabelle 4.2-3 Selektivität	79
Tabelle 4.2-4 LOD/LOQ	79
Tabelle 4.2-5 Linearität	80
Tabelle 4.2-6 Richtigkeit	82
Tabelle 4.5-1 QACs	96
Tabelle 4.5-2 QACs	98
Tabelle 4.5-3 QACs	100
Tabelle 4.5-4 QACs	101
Tabelle 4.5-5 QACs	104



Tabelle 4.5-6 QACs	108
--------------------	-----

## Formelverzeichnis

Formel 2.4-1	Verteilungskoeffizient, K	27
Formel 2.4-2	chromatographische Auflösung, R	28
Formel 2.4-3	Trennstufenhöhe, H	29
Formel 2.4-4	Extinktion, $E_\lambda$	30
Formel 2.4-5	freie Enthalpie, $dG^{\text{gesamt}}$	39
Formel 2.4-6	freie Enthalpie, $dG^{\text{LösungA}}$	39
Formel 2.4-7	chemisches Potential, $\mu^{\text{LösungB}}$	40
Formel 2.4-8	freie Enthalpie, $dG^{\text{gesamt}}$	40
Formel 2.4-9	chemisches Potential, $\mu^{\text{LösungA}}$	40
Formel 2.5-1	chromatographische Auflösung, R	40
Formel 2.5-2	Nachweisgrenze, NG	41
Formel 2.5-3	Bestimmungsgrenze, BG	41
Formel 2.5-4	Richtigkeit, R	42
Formel 2.5-5	t-Wert, t	42
Formel 2.6-1	Enzymatische Umsetzung	43
Formel 2.6-2	Michaliskonstante, $K_m$	43
Formel 2.6-3	Gasmenge Relativ, $G_\%$	44
Formel 3.2-1	Adsorptionsgrad	51
Formel 3.5-1	Richtigkeit, LC-MS	60

## Inhaltsverzeichnis

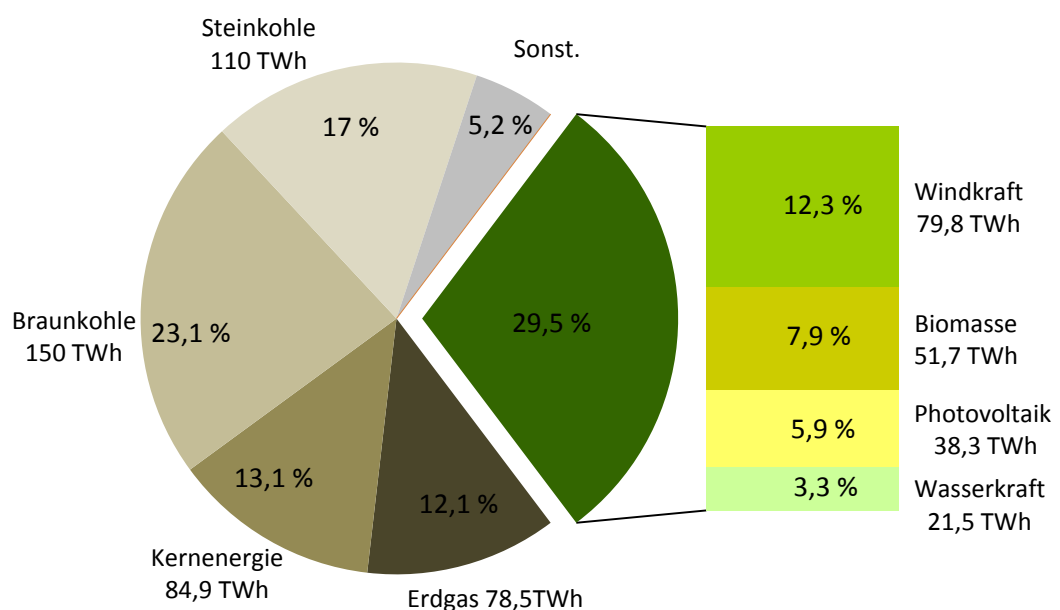
<b>KURZZUSAMMENFASSUNG (DEUTSCH)</b>	<b>I</b>
<b>ABSTRACT (ENGLISH)</b>	<b>II</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>III</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>V</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>IX</b>
<b>FORMELVERZEICHNIS</b>	<b>X</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>XI</b>
<b>1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG</b>	<b>1</b>
1.1 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	3
<b>2 STAND DES WISSENS UND DER TECHNIK</b>	<b>4</b>
2.1 GLYPHOSAT	4
2.1.1 Anwendung	4
2.1.2 Wirkung	5
2.1.3 Umweltverhalten, Verteilung und Abbau von Glyphosat in der Umwelt	5
2.2 QUATERNÄRE AMMONIUMVERBINDUNGEN	7
2.2.1 Anwendung	8
2.2.2 Wirkung	10
2.2.3 Abbau	11
2.2.4 Vorkommen in der Umwelt	14
2.2.5 Stoffauswahl der QACs	16
2.3 GRUNDLAGEN DER BIOGASERZEUGUNG	18
2.3.1 Anaerober Abbau	18
2.3.2 Biogasanlagen	19
2.3.3 Wichtige Prozessparameter des anaeroben Abbaus	21
2.4 PROZESSANALYTIK UND ANALYTISCHE METHODEN	25
2.4.1 Prozessanalytik	25
2.4.2 Hochleistung-Flüssigkeits-Chromatographie	26
2.4.3 Massenspektrometrie	32
2.4.4 Ionen-Chromatographie	35
2.4.5 Dialyse	38
2.5 VALIDIERUNG	40
2.5.1 Selektivität	40
2.5.2 Nachweis- und Bestimmungsgrenze	41
2.5.3 Linearität	41
2.5.4 Richtigkeit	41
2.5.5 Präzision	42
2.5.6 Robustheit	42
2.6 KINETISCHE AUSWERTUNG	42
2.6.1 Michaelis-Menden Theorie	43
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>46</b>

3.1	LABOR BIOGASREAKTOR	46
3.1.1	Eudiometer Versuchsdurchführung	47
3.1.2	Herstellung der Sperrflüssigkeit	47
3.1.3	Batch Versuchsreihen	48
3.1.4	Impf Schlamm	48
3.2	AEROBREAKTOR	49
3.2.1	Adsorptionsversuch	51
3.3	FETTSÄUREANALYSE	51
3.3.1	Ionenchromatographie Methode	52
3.3.2	Aufarbeitung von realen Proben	53
3.3.3	Validierung der Ionenchromatographie	53
3.4	ONLINEDIALYSE	55
3.5	MASSENSPEKTROMETRIE	56
3.5.1	HPLC-MS/MS Methode	56
3.5.2	Probenaufarbeitung für wässrige Proben	57
3.5.3	Probenaufarbeitung für feste oder flüssig/feste Proben	58
3.5.4	Validierung der HPLC-MS/MS	59
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b>	<b>61</b>
4.1	VALIDIERUNG DER IONENCHROMATOGRAPHIE	61
4.1.1	Selektivität	61
4.1.2	Nachweis- und Bestimmungsgrenze	63
4.1.3	Linearität	64
4.1.4	Richtigkeit	67
4.1.5	Präzision	67
4.1.6	Robustheit	68
4.2	METHODENENTWICKLUNG UND VALIDIERUNG ZUR BESTIMMUNG VON QACS MITTELS LC-MS/MS	70
4.2.1	Massenspektren	70
4.2.2	MRM Methode	74
4.2.3	Chromatographische Methode	75
4.2.4	Validierung der Methode zur Bestimmung von quaternären-Ammoniumverbindungen aus festen und flüssigen Proben mittels LC-MS/MS	76
4.3	ONLINEDIALYSE	83
4.3.1	Bestimmung und Wiederfindung in Abhängigkeit zur Fließgeschwindigkeit	83
4.3.2	Optimierung der Wiederfindung durch Variation des pH-Wertes der Akzeptorlösung.	84
4.3.3	Validierung der Onlinedialyse	85
4.3.4	Einsatz der Onlinedialyse in anaerober Realmatrix	86
4.4	ERGEBNISSE ZUM EINFLUSS VON GLYPHOSAT AUF DIE BIOGASERZEUGUNG	87
4.4.1	Vorversuche zur Ermittlung der Hemmkonzentration von Glyphosat auf das anaerobe Milieu	87
4.4.2	Einfluss von Glyphosat auf die Biogaserzeugung im Konzentrationsbereich von 20 bis 40 mmol·L <sup>-1</sup>	90
4.4.3	Einfluss des Glyphosatmetaboliten AMPA auf die Biogaserzeugung im Konzentrationsbereich von 20 bis 60 mmol·L <sup>-1</sup>	92
4.4.4	Zusammenfassung Glyphosat und AMPA	92
4.5	ERGEBNISSE ZUM EINFLUSS VON QUATERNÄRE AMMONIUMVERBINDUNGEN AUF DIE BIOGASERZEUGUNG	94
4.5.1	Vorversuche zur Ermittlung der Wirkkonzentration von quaternären Ammonium-Verbindungen auf Mikroorganismenkulturen im anaerobe Milieu	95
4.5.2	Einfluss von Benzyl dodecyl dimethyl ammoniumchlorid auf die Biogaserzeugung im Konzentrationsbereich von 1 bis 10 mmol·L <sup>-1</sup>	96

4.5.3	Einfluss von Benzylhexadecyldimethylammoniumchlorid auf die Biogaserzeugung im Konzentrationsbereich von 1 bis 10 mmol·L <sup>-1</sup>	98
4.5.4	Vergleich des Einflusses von BDMA-C12 zu BDMA-C16 auf die Biogaserzeugung im gleichen Konzentrationsbereich	98
4.5.5	Einfluss von Dodecyltrimethylammoniumchlorid auf die Biogaserzeugung im Konzentrationsbereich von 1 bis 10 mmol·L <sup>-1</sup>	100
4.5.6	Einfluss von Hexydecyltrimethylammoniumchlorid auf die Biogaserzeugung im Konzentrationsbereich von 1 bis 10 mmol·L <sup>-1</sup>	100
4.5.7	Vergleich des Einflusses von ATAM-C12 zu ATMA-C16 und der Vergleich von benzylierten und alkylierten QACs auf die Biogaserzeugung	101
4.5.8	Einfluss von Didecyldimethylammoniumbromid auf die Biogaserzeugung im Konzentrationsbereich von 1 bis 10 mmol·L <sup>-1</sup>	104
4.5.9	Testung der Mischung von BDMA-C12 und BDMA-C16 auf einen synergistischen Effekt	105
4.5.10	Testung der Mischung von ATMA-C12 und ATMA-C16 auf einen synergistischen Effekt	106
4.5.11	Testung der Mischung von BDMA-C12, BDMA-C16 und DDMA-C10 auf einen synergistischen Effekt	108
4.5.12	Zusammenfassung der Wirkung von QACs auf die anaerobe Mischkulturen zur Biogaserzeugung	110
4.5.13	Aerober Abbau von QACs	113
4.5.14	Adsorption von QACs	115
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>118</b>
<b>6</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>120</b>
	<b>ANHANG</b>	<b>130</b>

## 1 Einleitung und Zielsetzung

Traditionelle Energieträger wie Erdgas, Kohle und Kernenergie decken ca. 70 % der Bruttostromerzeugung in Deutschland ab [1]. Die übrigen 30 % werden durch neue Techniken aus dem Sektor der erneuerbaren Energien geliefert. Spitzenreiter ist hier die Windkraft mit 12,3 % gefolgt von der Energiegewinnung aus Biomasse mit 7,9 % (siehe Abbildung 1.1-1) [1]. Durch den Ausstieg aus der Kernenergie und dem angestrebten Ziel, bis 2050 den Bruttostromverbrauch zu 80 % aus regenerativen Quellen abzudecken, werden konventionelle Energieträger mehr und mehr an Bedeutung verlieren [2]. Eine zentrale Rolle bei der Versorgung durch erneuerbare Energien soll hier die Offshore-Windenergie erhalten. Diese soll bereits 2020 auf 6.500 Megawatt (MW) und bis 2030 auf 15.000 MW ausgebaut werden. Dies ist gesetzlich im Erneuerbare-Energie-Gesetz (EEG) von 2017 festgelegt [3]. Offshore-Windparks zeichnen sich durch eine hohe Windstabilität und durch eine höhere Windstärke aus. Zusätzlich besitzen Offshore-Windparks eine hohe Akzeptanz in der Bevölkerung.



**Abbildung 1.1-1 Strommix:** Anteil der Energieträger gemessen an der Bruttostromerzeugung in Deutschland 2016 mit einer gesamt Stromerzeugung von 648 TWh [1]

Die Erzeugung von Strom- und Wärmeenergie aus Biomasse wird in der heutigen Form erst seit den letzten 25 Jahren betrieben und hat seitdem stetig zugenommen. Der rasante Anstieg der Zahl der nationalen Biogasanlagen ist vor allem auf die hohe Förderung in den letzten Jahren zurückzuführen, welche stark zurückgefahren wurde. Allerdings sollen gemäß EEG-2017 auch hier weitere Anlagen gefördert werden. Bis 2022 sollen neue Anlagen mit einer gesamt Kapazität von 1.150 MW entstehen [4]. Biogas und Biomasse zeichnen sich als hervorragender Energiespeicher aus und ermöglichen es,

Schwankungen aus Windenergie und Photovoltaik auszugleichen. Sie werden daher eine sehr wichtige Rolle im zukünftigen Energiemix in Deutschland spielen. Energiepflanzen wie Mais werden dabei an Bedeutung verlieren. Dies soll sowohl den ökologischen Folgen der Monokulturen, als auch der gesellschaftlichen Kritik des Maisanbaus entgegenwirken. Gesetzlich ist dies schon jetzt in Ansätzen geregelt. Neu zugelassene Biogasanlagen dürfen höchstens 50 %, und ab 2021 höchstens 44 % Masseanteil an Getreidekorn oder Mais verwenden [5]. Der Anteil an zurzeit wenig genutzten Reststoffen soll hierbei stetig zunehmen. Angestrebt werden soll eine Kaskadennutzung der angebauten nachwachsenden Rohstoffe. Neben Reststoffen, die z.B. bei der Herstellung und Verarbeitung von Nahrungsmitteln anfallen, ist Gülle ein wichtiger Energieträger, welcher auch jetzt schon vom Gesetzgeber gefördert wird ( $23,14 \text{ Cent} \cdot \text{kWh}^{-1}$  gegenüber  $13,05\text{-}14,88 \text{ Cent} \cdot \text{kWh}^{-1}$  z.B. bei Mais) [6].

Sowohl Gülle aber auch klassische Substrate wie Mais oder organische Reststoffe können durch anthropogene Verunreinigungen belastet sein und somit den anaeroben Biogasprozess stören. Beim Beispiel Mais sind diese anthropogenen Stoffe vor allem Pestizidrückstände. Kritisch sind besonders Pestizide, welche beim Sikkationsverfahren Anwendung finden. Hierbei werden Pestizide bis zu 7 Tage vor der Ernte auf Teilflächen der Felder ausgebracht. Da hierdurch der Erntevorgang erleichtert wird, wurde dies in der Vergangenheit gelegentlich angewendet, um den Erntezeitpunkt zeitlich zu bestimmen, was in Deutschland verboten ist [7]. Besonders in der Kritik steht dabei das Pestizid Glyphosat. Hohe Befunde von Glyphosat in Futtermitteln von  $0,4\text{-}0,9 \text{ mg Glyphosat} \cdot \text{kg}^{-1}$  in Deutschland lassen den Schluss zu, dass wahrscheinlich die Anwendung kurz vor der Ernte dazu führt, dass beachtliche Mengen an Glyphosat auf dem Erntegut zurückbleiben und somit in die Biogasanlage gelangen können [8].

Des Weiteren können durch Gülle, welche bei der Massentierhaltung anfällt, Arzneimittel, darunter insbesondere Antibiotika, in den anaeroben Gärprozess gelangen. Erhebungen des österreichischen Umweltbundesamtes haben Antibiotikarückstände in Gülle von bis zu  $770 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ TS}$  und im Gärrest von  $24 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ TS}$  festgestellt. Darüber hinaus wurden auch Bestandteile von Veterinärdesinfektionsmitteln wie z.B. Quaternäre Ammoniumverbindungen (engl. *quaternary ammonium compounds*, QACs) in Gärresten mit Konzentrationen von bis zu  $119 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ TS}$  festgestellt [9].

Neben der potenziellen betrieblichen Beeinträchtigung, welche von einer Minderung der Gasproduktion bis hin zum Erliegen der Biozönose gehen kann und wegen der damit verbundenen kostspieligen Entsorgung des belasteten Substrates, ist die spätere Ausbringung von Gärresten in Form von Wirtschaftsdüngern kritisch zu betrachten. Die oberflächliche Aufbringung von

Wirtschaftsdünger kann zum sogenannten *Runoff* (Abspülen) der anthropogenen Stoffe vom Feld und zum Eintrag dieser in den Wasserkreislauf führen [10, 11].

## 1.1 Zielsetzung der Arbeit

Am Beispiel von fünf unterschiedlichen QACs und am Beispiel des Pestizides Glyphosat mit seinem Metaboliten AMPA (Aminomethylphosphonsäure) soll der Effekt auf Biogasverfahren im anaeroben Milieu untersucht werden. Es soll die Biogasbildung bei unterschiedlichen, praxisnahen Konzentrationen der genannten Stoffe im Labormaßstab und im Miniplant-Maßstab bestimmt werden. Da beim anaeroben Abbau unterschiedliche Mikroorganismen wie Archaeen (Methanogenese), extrazelluläre Enzyme (Hydrolyse), gram-positive und gram-negative Bakterien (Acetogenese und Acidogenese) beteiligt sind [12], soll untersucht werden, welche Mikroorganismen am stärksten beeinflusst werden und welche weniger oder gar nicht. Hierzu sollen die Fettsäureprofile der einzelnen Proben analysiert und bewertet werden. Von besonderem Interesse ist die Wirkung auf die Archaeen (Methanogene), da ein Effekt auf Archaeen durch QACs bisher noch nicht im Detail beschrieben wurde [13]. Darüber hinaus sollen Aussagen über Struktur-Wirkung-Beziehungen der Unterschiedlichen QACs getroffen werden. Wie bereits aus der Literatur bekannt ist, sind QACs anaerob nicht abbaubar [14]. Daher soll der aerobe Abbau dieser Substanzen getestet werden. Die aeroben Abbaustudien der QACs sollen es ermöglichen, Verfahrensempfehlung für den Umgang von belasteten Substraten und/oder Wirtschaftsdüngern zu geben. Hier können Vor- oder Nachbehandlungen der Biomasse zu einer geringeren Umweltbelastung führen.

## 2 Stand des Wissens und der Technik

Im folgenden Kapitel wird zunächst einleitend auf die getesteten Wirkstoffe, Glyphosat und quaternären Ammoniumverbindungen eingegangen (Kapitel 2.1 bis 2.2). Dabei stehen vor allem die Anwendung und das Umweltverhalten dieser Stoffe im Vordergrund. Im Anschluss wird der anaerobe Abbau und die technische Biogaserzeugung erläutert (Kapitel 2.3). Der letzte Teil des Kapitels widmet sich der verwendeten Analysetechniken, Validierung und kinetische Auswertung (Kapitel 2.4 bis 2.5).

### 2.1 Glyphosat

Glyphosat (N-Phosphonomethylglycin) ist ein nicht selektives Breitbandherbizid und ist in Deutschland und weltweit das am weitesten verbreiteste Pestizid [15]. Es ist vor allem durch das Produkt Roundup® der Firma Monsanto auf dem Markt vertreten. Allerdings gibt es darüber hinaus in Deutschland allein 76 Produktformulierungen, welche Glyphosat enthalten, welche nicht alle von Monsanto sind [16]. Die Zulassung von Glyphosat für den europäischen Markt wurde 2015 um ein weiteres Jahr und 2016 um 18 Monate verlängert (ABIEG Nr. L293/48 v. 10.11.2010, S. 1-10; ABIEG Nr. L276/48 v. 20.10.2015, S1-4, [17]). Auf wissenschaftlicher und politischer Ebene findet bereits seit seiner Einführung vor 40 Jahren eine rege Diskussion statt. Dabei geht es zum einen sowohl um die Toxizität/Kanzerogenität als auch um den Abbau von Glyphosat in der Umwelt [18]–[26].

#### 2.1.1 Anwendung

Glyphosat bzw. glyphosathaltige Pflanzenschutzmittel sind in Deutschland im Ackerbau sehr stark verbreitet. 2012 ergab eine Umfrage, dass 39 % der Ackerflächen in Deutschland mit Glyphosat behandelt werden [27]. Bei Winterraps, Körnerleguminosen und Wintergerste lag der Anteil an Applikationsfläche sogar bei 65 % bis 87 %. Im Wesentlichen gibt es drei wichtige Einsatzverfahren:

- a) Vorsaatterverfahren
- b) Vorernteverfahren (Sikkationsverfahren)
- c) Nachernteverfahren

Besonders kritisch ist hierbei das Vorernteverfahren einzuschätzen. Hierbei wird Glyphosat 7-14 Tage vor dem Ernten auf Teilflächen des Feldes ausgebracht, um Unkrautdurchwuchs oder Zwiewuchs (ungleiche Abreife) in lagernden oder stehenden Pflanzen entgegenzuwirken. Glyphosat bewirkt dabei, dass Unkräuter oder Zwiewuchs verdorrt und somit ein besserer Erntevorgang ermöglicht wird. Dies ist gesetzlich in Deutschland nur in Ausnahmefällen erlaubt. Die Anwendung von Glyphosat zur zeitlichen Steuerung des Erntetermins oder Dreschoptimierung ist gesetzlich



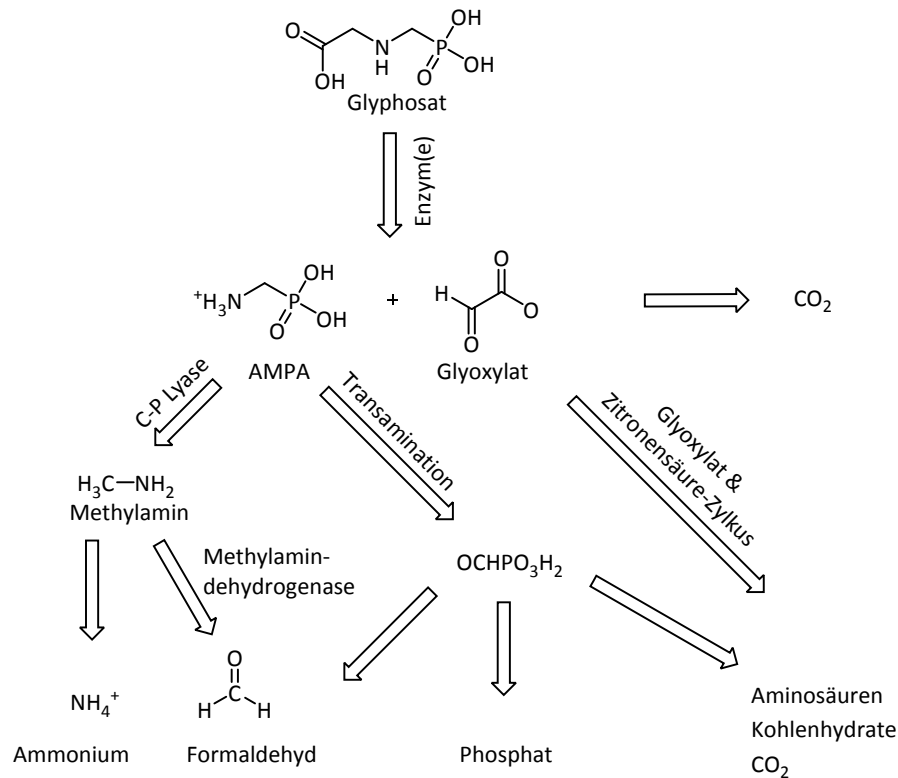
verboten [7]. Erhöhte Befunde von belasteten Futtermitteln oder Lebensmitteln lassen aber vermuten, dass dies nicht immer eingehalten wird [8].

### 2.1.2 Wirkung

Die hohe und selektive Wirksamkeit von Glyphosat liegt in der Inhibierung der in Pflanzen, Pilzen und Bakterien vorkommenden 5-Enolpyruvyl Shikimate 3-Phosphat Synthase (EPSPS), welche für die Biosynthese von aromatischen Aminen (Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan) eine wichtige Rolle spielt [15, 28]. Die Reduzierung des Co-Faktors Flavinmononucleotide (FMN) benötigt Mangan, welches durch Glyphosat komplexiert wird und somit die EPSPS inhibiert. Dieser Vorgang, welcher nicht auf Pflanzen begrenzt ist, stellt den Grund dafür dar, warum auch Bodenorganismen von behandelten Flächen beeinflusst werden [14, 26]. Darüber hinaus zeigt Glyphosat bei geringen Konzentrationen zytotoxische Effekte auf Humane-Plazenta-Zellen, embryonale Nieren- und Leber-Zelllinien [18]. Des Weiteren wird beobachtet, dass Glyphosat einen negative Effekt auf das mikrobielle Gleichgewicht des Magen-Darm-Tracts bei Kühen und potentiell auch beim Menschen hat [8, 29, 30]. Es wird vermutet, dass belastete Futtermittel die Ursache ist.

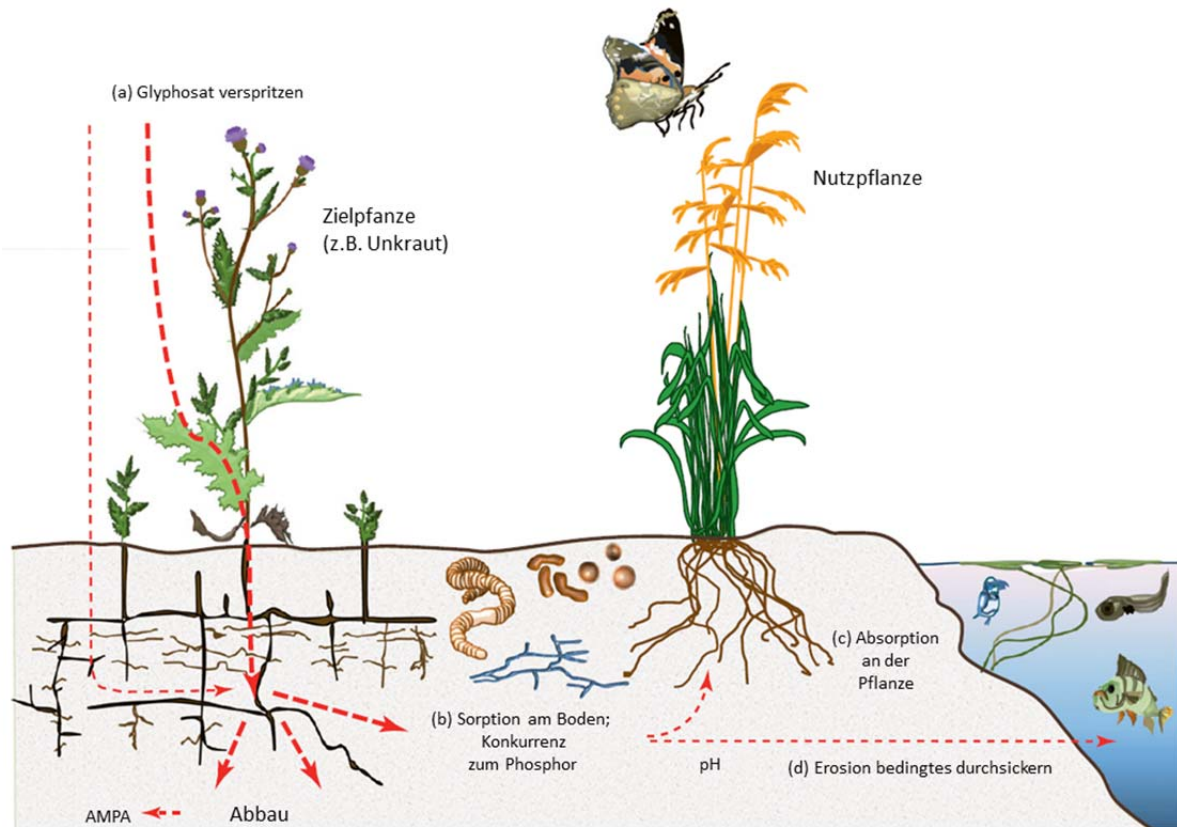
### 2.1.3 Umweltverhalten, Verteilung und Abbau von Glyphosat in der Umwelt

Glyphosat gilt von Hersteller- und Behördenseite aus vor allem deshalb als sicher, da es eine sehr geringe Biomobilität aufweist und sehr schnell und stark an Bodenpartikeln adsorbiert wird [31, 32]. Hinzu kommt, dass der sehr geringe Oktanol/Wasser-Koeffizient ( $K_{ow}=0,00033$ ) impliziert, dass die Elutionskraft von Wasser nicht ausreicht, um Glyphosat in großen Mengen von den Partikeln abzuspielen (engl. *runoff*). Glyphosat wird nicht in der Pflanze abgebaut, sondern ausschließlich durch Mikroben im Boden [15, 23, 32, 33]. Hierbei wird Glyphosat zu seinem Hauptmetaboliten Aminomethylphosphonsäure (AMPA) abgebaut und im Idealfall anschließend im Boden mineralisiert [34].



**Abbildung 2.1-1 Glyphosat Abbau:** Abbauweg von Glyphosat zu AMPA und der folgenden Mineralisierung [34]

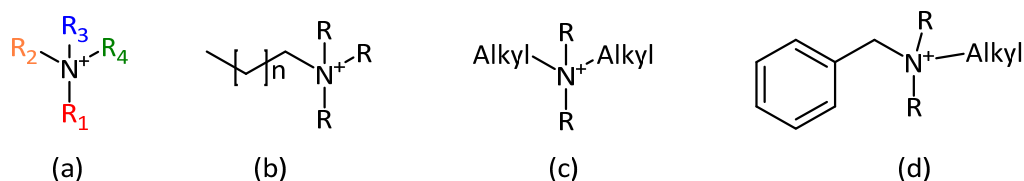
Die Komplexität von Böden und den unterschiedlichen meteorologischen Gegebenheiten führen dazu, dass die Bandbreite der publizierten Halbwertszeiten von Glyphosat stark schwankt [34]. In Gegenwart von starken Kationen wie  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Al}^{2+}$  bildet Glyphosat Komplexverbindungen, welche langsamer abgebaut werden als freies Glyphosat [35, 36]. Auch der pH-Wert des Bodens spielt eine enorme Rolle für die Biomobilität von Glyphosat. Hierbei führen niedrige pH-Werte zu einer besseren Adsorption an mineralischen Partikeln [37]. Phosphor, welches in Studien die gleiche Adsorptions-Kinetik wie Glyphosat am Boden aufweist, steht in direkter Konkurrenz und kann so die Adsorption zumindest teilweise verhindern [38]. Außerdem ist anzunehmen, dass Böden, die seit mehreren Jahrzehnten Glyphosat ausgesetzt sind, dies gar nicht mehr adsorbieren können. Neben der Bodeneigenschaft muss auch das Wurzelwerk der Zielpflanze in Betracht gezogen werden. Wie bereits erwähnt, wird Glyphosat nicht in der Pflanze abgebaut und wird somit über die Wurzeln in den Boden eingebracht. Dies erklärt auch die immer häufigeren und höheren Glyphosatbefunde in Böden, Gewässern und Lebensmitteln [39]–[43].



**Abbildung 2.1-2 Umweltverteilung von Glyphosat:** Verteilungsweg von Glyphosat im Boden [35]

## 2.2 Quaternäre Ammoniumverbindungen

Quaternäre Ammonium Verbindung (QACs, engl. *quaternary ammonium compounds*) haben eine hohe wirtschaftliche Bedeutung, da sie in unterschiedlichen Produkten wie zum Beispiel Desinfektionsmitteln, Bioziden, Detergenzien, Phasen-Transfer-Vermittlern und in diversen Körperpflegeprodukten eingesetzt werden. Der weltweite Jahresverbrauch von QACs wird auf insgesamt 350.000 bei 500.000 Tonnen geschätzt [44, 45]. Sie gehören der Stoffklasse der kationischen Tenside an und besitzen einen hydrophilen und ein bis zwei hydrophobe Alkylketten. Die hydrophile Gruppe ist der namensgebende 4-fach substituierte Ammoniumrest. Die vier Substituenten erzeugen eine positive Ladung des Stickstoffatoms und verursachen letztlich die hydrophilen Eigenschaften (Abbildung 2.2-1 a). QACs lassen sich anhand ihrer funktionellen Gruppen in drei Hauptklassen unterteilen: Monoalkyl-Ammonium-Ionen (Abbildung 2.2-1 b), Dialkyl-Ammonium-Ionen (Abbildung 2.2-1 c) und Benzyl-Alkyl-Ammonium-Ionen (Abbildung 2.2-1 d). Die hydrophobe Gruppe besitzt eine Kettenlänge von 4 -18 C-Atomen. Als Gegenionen kommen Chlorid oder Bromid zum Einsatz.



**Abbildung 2.2-1 Struktur QACs:** (a) Generelle Struktur von QACs, (b) Alkylrest, (c) Dialkylrest, (d) Benzylrest

Gemäß IUPAC werden die Substituenten im Präfix gemäß der Priorität genannt und anschließend die Ammoniumgruppe als Suffix. Die Alkylgruppen haben die geringste Priorität und werden als letztes vor der Ammonium-Suffix genannt. Innerhalb der verschiedenen Alkylreste wird alphabetisch sortiert. Bei Abkürzungen findet man in der Literatur unterschiedliche Bezeichnungen, da dies nicht gemäß IUPAC geregelt ist. In der vorliegenden Arbeit ist die gängigste Variante verwendet worden. Hierbei wird die hydrophobe Alkylkette mit A (alkyl) bezeichnet und die Kettenlänge als letzte Information angehängt z.B. -C12. Die Methylgruppen werden je nach Anzahl mit DM (dimethyl) oder TM (trimethyl) abgekürzt. Bei Molekülen mit zwei hydrophoben Alkylketten werden diese nur mit D (di) abgekürzt und die Kettenlänge ebenfalls als letztes angegeben. Unterschiedlich langen Ketten werden gemäß der Länge sortiert genannt, z.B. -C10/C16. Benzylgruppen werden mit „B“ abgekürzt.

**Tabelle 2.2-1 Abkürzung QACs:** Die drei Hauptklassen der QACs mit der generelle Strukturformel und der Abkürzung

Name	Strukturformel	Abkürzung
Monoalkyl-Ammonium-Ionen		ATMA-Cn
Dialkyl-Ammonium-Ionen		DDMA-Cn
Benzyl-Alkyl-Ammonium-Ionen		BDMA-Cn

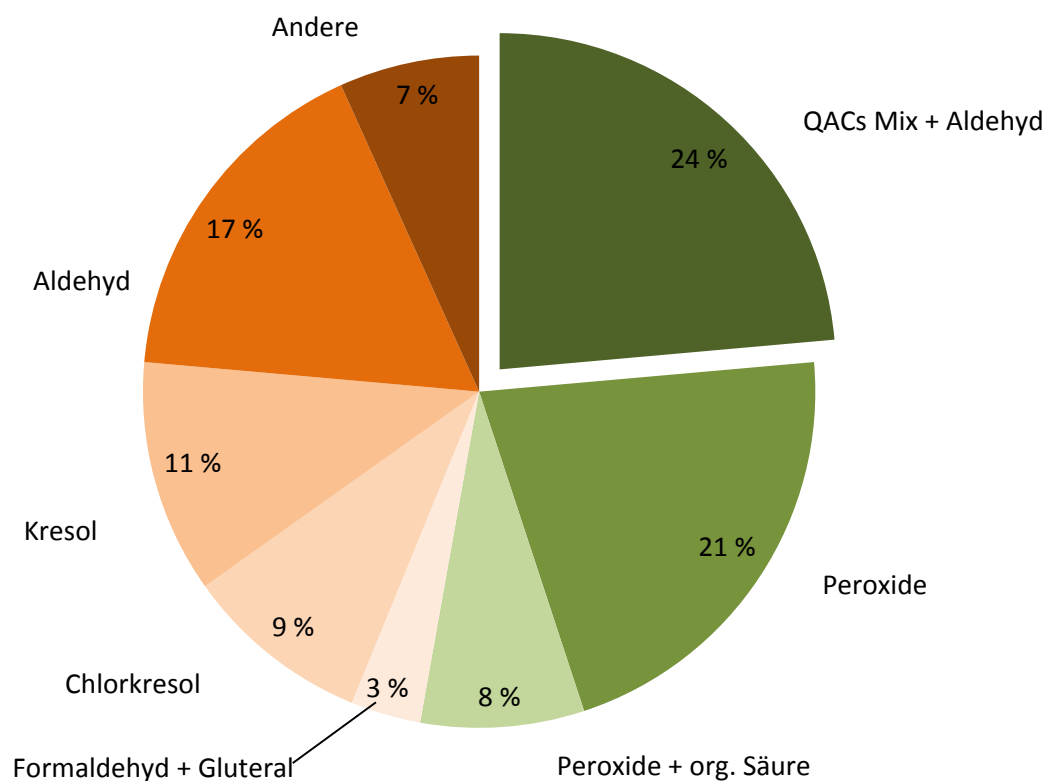
n = Anzahl der C-Atome

### 2.2.1 Anwendung

Der Ausschuss „Desinfektion in der Veterinärmedizin“ der Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V. (DVG) gibt, gemäß seiner Richtlinien verschiedene Listen mit geprüften und als wirksam befundenen Desinfektionsmitteln heraus. Hierbei werden drei Bereiche unterschieden[46]:

- Lebensmittelproduktion und Lebensmittelverarbeitung inklusive Großküchen
- Tierhaltung
- Tierärztliche Praxen und Tierheime

Für die Tierhaltung sind 89 (Stand 23.12.2016 [46]) Handelspräparate aufgeführt (siehe Anhang), wobei die Liste einer ständigen Überarbeitung unterliegt [46]. Mit 21 Handelsprodukten sind QACs, neben Peroxiden, die wichtigste Wirkstoffklasse der Veterinärdesinfektionsmittel (siehe Abbildung 2.2-2). Dabei werden QACs-haltige Desinfektionsmittel nie als Monoprodukte eingesetzt, sondern immer in eine Mischung aus verschiedenen QACs und einem Aldehyd-Zusatz (z.B. Gluteral oder Formaldehyd) [47]. Zum Einsatz kommen überwiegend Benzyl-Alkyl-Ammonium (C12 und C16) sowie Dialkyl-Ammonium (C10) Verbindungen.



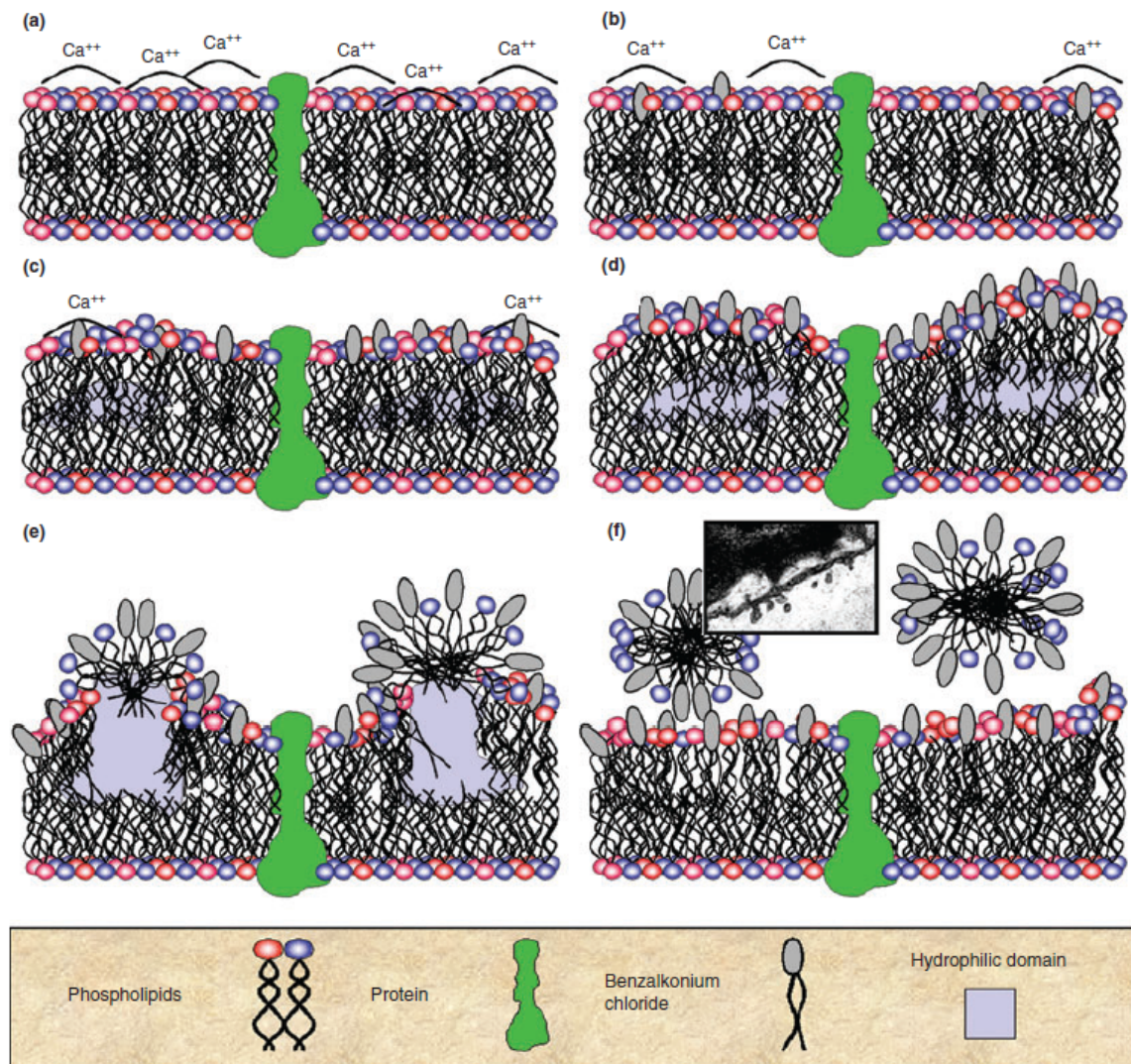
**Abbildung 2.2-2 Produktübersicht von Desinfektionsmitteln:** Aufteilung der von der DVG empfohlenen Handelsprodukte gemäß der Wirkstoffe [46]

Bei der Desinfektion von z.B. Schweineställen werden Stallflächen, Böden, Wände, Decken, Einbauten, Lüftungssysteme, Futtersilos, Tröge, Stiefel, Geräte und Stallwerkzeuge mit dem Desinfektionsmittel besprüht. Das Desinfektionsmittel wird anschließend nicht abgespült, sondern verbleibt auf den Flächen. Somit vermengen sich die Wirkstoffe im Laufe der Zeit mit Kot, Mist, usw.

und werden erst bei der nächsten Stallreinigung entfernt [48]. Darüber hinaus werden bei Milchbetrieben die Melkzeuge wie Melkgeschirr etc. durch eintauchen oder durchziehen desinfiziert. Da Melkzeuge und Apparaturen zur Milchabfüllungen in direkten Kontakt mit dem Endprodukt Milch treten, sollte hier mit besonderer Sorgfalt gearbeitet werden [49].

### 2.2.2 Wirkung

Wie bereits in 2.2.1 erwähnt, werden QACs als Desinfektionsmittel und Biozide eingesetzt. Dabei bewirken die QACs auf zellulärer Ebene den Zelltod auf zwei unterschiedlichen Wegen. Die hydrophoben Eigenschaften der QACs führen zu einer Anreicherung der Moleküle in den hydrophoben Zellmembranen der Bakterien. Bei geringen Konzentrationen induziert dies eine Störung der Osmoregulation der Zelle und der metabolischen Prozesse der Zellmembran [50]. In Folge dessen kommt es zu einer Beeinträchtigung der Zellfunktionen (Abbildung 2.2-3 a-c). Höhere Konzentrationen haben zur Folge, dass es zu einer starken Beeinträchtigung der physiologischen Funktion der Zellmembran kommt. Einzelne Zellbestandteile können dabei aus der Zelle austreten. Im weiteren Verlauf kommt es zu einem Aufbrechen der Membran und letztendlich zur Zelllysis (Abbildung 2.2-3 d-f) [51].



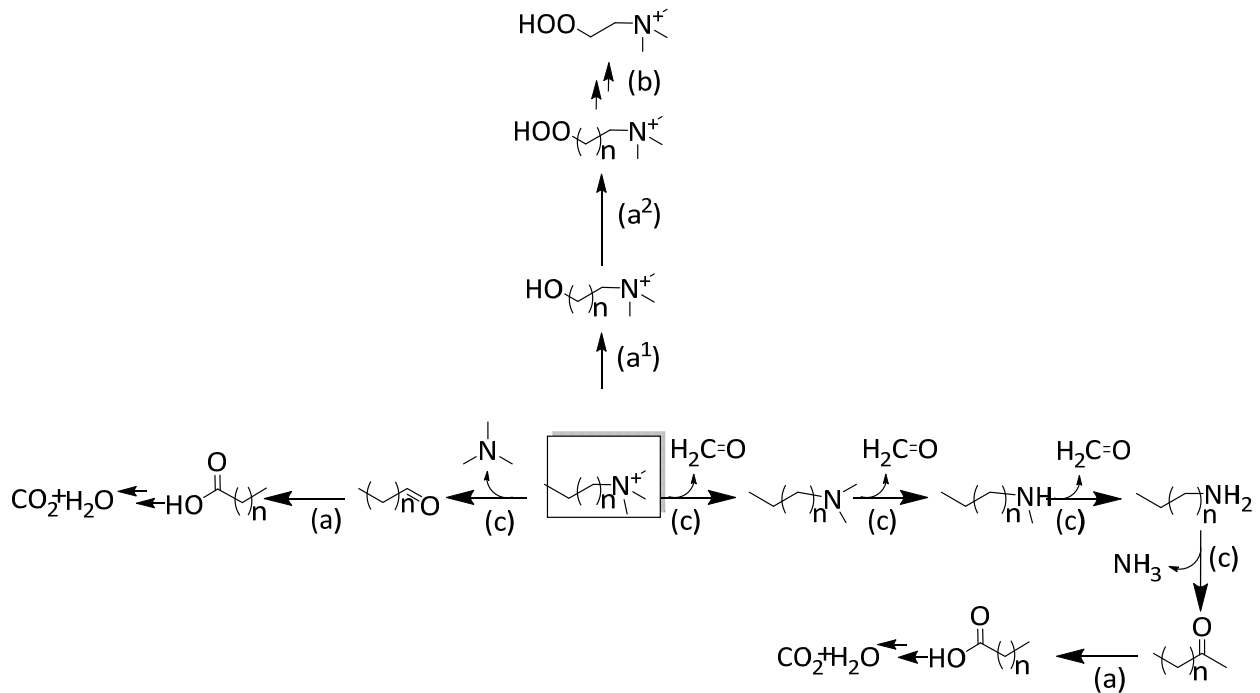
**Abbildung 2.2-3 Wirkungsmechanismus von QACs:** Illustration des antimikrobiologischen Effektes von QACs. Segment a-f zeigt die zunehmende Anreicherung der QACs in der Zellmembran. In c-d ist bereits die Störung der physiologischen Wirkung zu erkennen. In e-f ist die Lysis der Zelle dargestellt [51]

### 2.2.3 Abbau

QACs gelten wie viele andere Tenside als anaerob nicht abbaubar [14]. Dies ist besonders kritisch für den anaeroben Biogasprozess, da diese Substanzen somit im vollen Umfang in der dortigen Biozönose wirken können [45]. Für den aeroben Abbau gibt es mögliche Abbaupfade, die vom primären Abbau bis hin zur vollständigen Mineralisierung möglich sind. Zwei Grundsätzliche Reaktionstypen sind denkbar:

- $\omega$ - und  $\beta$ -Oxidation, was zu einem sukzessiven Abbau der Alkylkette führt
- C-N-Spaltung zwischen den Alkylgruppen und dem Ammoniumgruppe



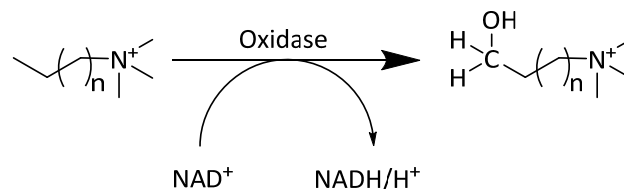


**Abbildung 2.2-4 Abbaumechanismus QACs:** Exemplarischer aerober Abbauweg eines Monoalkyl-Ammonium-Ion ( $a^1$ ,  $a^2$ )  $\omega$ -Oxidation, (b)  $\beta$ -Oxidation, (c) C-N-Spaltung [45]

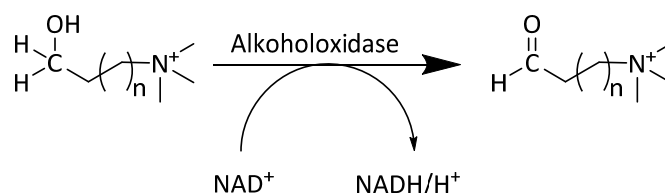
### 2.2.3.1 $\omega$ -Oxidation

Bei der  $\omega$ -Oxidation handelt es sich um eine Vorstufe der  $\beta$ -Oxidation. Hierbei wird an einer Alkylkette eine Carboxylgruppe eingeführt. Dies erfolgt reduktiv durch Oxidation des äußersten C-Atoms der Alkylkette in mehreren Schritten. Im ersten Schritt wird durch Oxidasen eine Hydroxygruppe am C-Atom eingeführt (Abbildung 2.2-5). Im zweiten Schritt wird diese Hydroxygruppe durch Alkoholoxigenasen zu einer Aldehydgruppe umgesetzt. Im dritten und letzten Schritt erfolgt die weitere Oxidation zur Carboxylgruppe [53, 54].

#### Schritt 1: Einführung der Hydroxygruppe

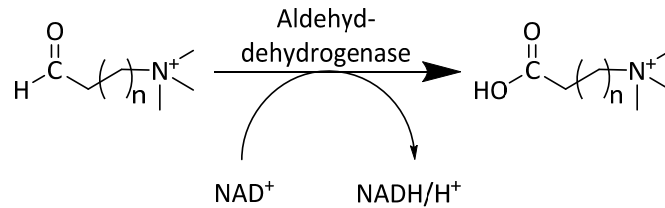


#### Schritt 2: Oxidation der Hydroxygruppe zur Aldehydgruppe



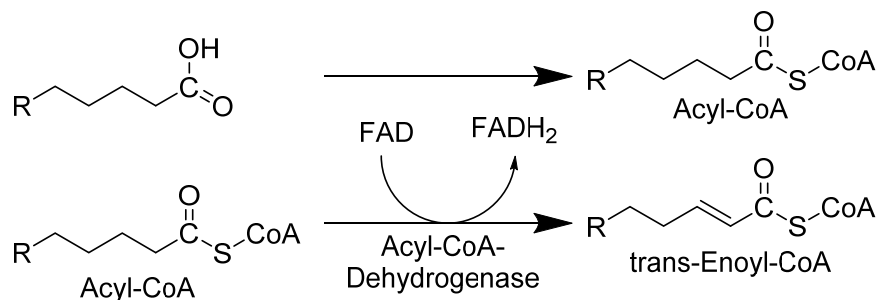


## Schritt 3: Oxidation der Aldehydgruppe zur Carboxylgruppe

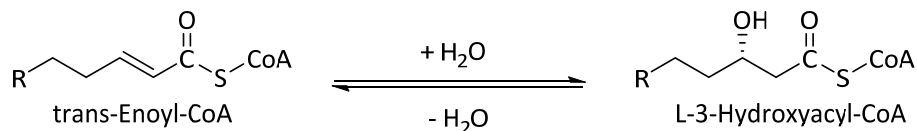
**Abbildung 2.2-5  $\omega$ -Oxidation:** Oxidation eines Monoalkyl-Ammonium-Ion [53, 54].2.2.3.2  $\beta$ -Oxidation

Bei der  $\beta$ -Oxidation werden normalerweise Fettsäuren abgebaut. Im Fall der QACs wird hier die durch die  $\omega$ -Oxidation umgewandelte Alkylkette abgebaut. Der gesamte Vorgang lässt sich in vier Reaktionen unterteilen. Im ersten Schritt wird durch das Enzym Acyl-CoA-Dehydrogenase eine Doppelbindung dem zweiten und dritten Kohlenstoffatom gebildet. Anschließend wird im zweiten Schritt eine Hydratisierung der Doppelbindung durchgeführt, was eine Hydroxygruppe am dritten Kohlenstoffatom zur Folge hat. Dieser Vorgang wird durch die Enoyl-CoA-Hydratase katalysiert. Die entstandene Hydroxygruppe wird im dritten Schritt mit Hilfe der Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase zu einem Keton oxidiert. Im abschließenden vierten Schritt wird unter Aufnahme eines Coenzym A das Molekül zwischen dem zweiten und dritten Kohlenstoffatom gespalten [53, 54].

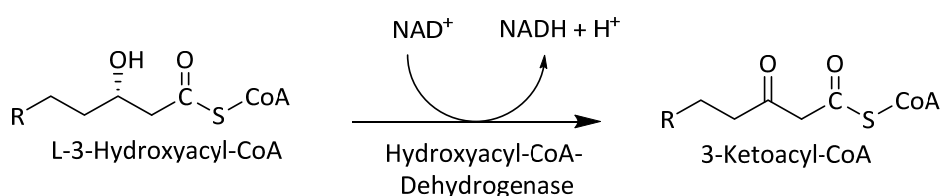
Schritt 1 Bindung des CoA und die oxidative Bildung einer Doppelbindung:



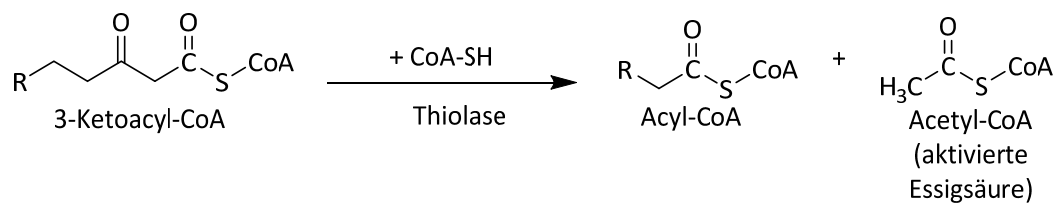
Schritt 2 Hydratisierung:



Schritt 3 Oxidierung der Hydroxygruppe:



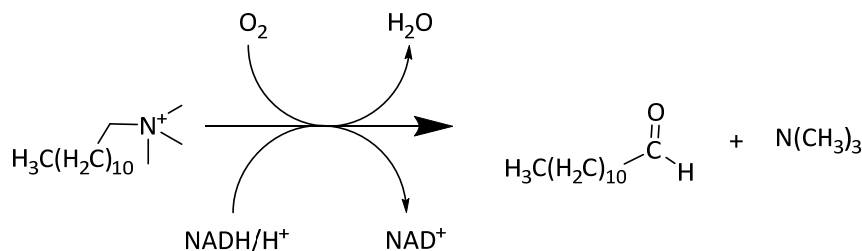
Schritt 4 Spaltung (Thiolyse):



**Abbildung 2.2-6  $\beta$ -Oxidation:** Schematische Darstellung der Oxidation einer Fettsäure [53, 54].

### 2.2.3.3 C-N-Spaltung

Van Ginkel und Kollegen beschrieben 1992 die direkte Spaltung der C-N Bindung anhand von Hexadecyltrimethylammonium und *Pseudomonas* Stamm B1. Hierbei wird durch Monooxygenase die direkte Spaltung aktiviert und der N-ständige Kohlenstoff zum Aldehyd oxidiert. Der entstandene Aldehyd kann im weiteren Verlauf sofort über die  $\beta$ -Oxidation abgebaut werden. Das entstandene Trimethylammonium wird komplett mineralisiert [45, 55].



**Abbildung 2.2-7 C-N Spaltung:** Schematische Darstellung der C-N Spaltung am Beispiel von Dodecyltrimethylammonium katalysiert durch Monooxygenase.

### 2.2.4 Vorkommen in der Umwelt

Der Eintragspfad von QACs in die Umwelt kann in zwei Hauptkategorien unterteilt werden, die sich sowohl in der Exposition als auch im Umweltverhalten unterscheiden. Dabei bezieht sich der Eintrag durch Industrie und Kommunen hauptsächlich auf QACs aus Reinigungsmitteln, Kosmetik und Desinfektionsmitteln, welche über das Abwasser in die Kläranlagen und dann in die Oberflächengewässer gelangen. Ein Großteil der QACs, die über das Abwasser in die Kläranlage kommen, werden allerdings am Klärschlamm adsorbiert. Hierbei spielen die entgegengesetzten Ladungen von QACs (positiv) und Klärschlamm (negativ, [55]) eine entscheidende Rolle. Der Eintrag von Veterinärdesinfektionsmitteln in der Umwelt erfolgt über Wirtschaftsdünger. Hierbei gelten, gemäß Düngemittelverordnung (DüMV) Reinigungs- und Desinfektionsmittelabwasser, welche aus agrarwirtschaftlichen Reinigungsprozessen kommen, als zulässige Nebenbestandteile von Düngemitteln. Darüber hinaus gelten auch Reststoffe aus anaeroben Biogasprozessen als zulässige Düngemittel [56].

Eine sehr umfangreiche Umweltstudie zu QACs in Oberflächenwasser, Abwasser, Sediment und Klärschlamm wurde 2007 vom österreichischen Umweltbundesamt durchgeführt, welche teilweise erhöhte Grenzwerte feststellte [58, 59].

#### 2.2.4.1 Konzentration in Abwässern

In kommunalen Abwässern wurden maximale Konzentrationen von BDMA-C12, BDMA-C14 und DDMA-C10 von  $170 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  gefunden [58, 59]. Im Vergleich dazu lagen die Messwerte für Alkyl-Trimethyl-Ammoniumverbindungen bei maximal  $<10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . In Deutschland wurden durch Kreuzinger et al. [59] für QACs Messwerte von unter  $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  dokumentiert. Einzig BDMA-C12 hatte mit  $4,1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  eine erhöhte Konzentration [59]. Die Studie zeigt, dass die mittlere Abbaurate bei  $>90\%$  lag.

#### 2.2.4.2 Konzentration in Klärschlamm

Neben dem biologischen Abbau in Kläranlagen unterliegen QACs besonders Adsorptionsvorgängen an Klärschlamm. Aufgrund der positiven Ladung der QACs und der in der Regel negativ geladenen Schlammflocke ist die Affinität besonders hoch [55]. Für DDMA, ATAC und BDMA wurden Konzentrationen von 27 bis  $103 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  TS in drei österreichischen Kläranlagen nachgewiesen [60]. Merino et. al ermittelte Konzentrationen von 0,1 bis  $34 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  TS in zwei spanischen Kläranlagen [61]. Außerhalb von Europa wurden sehr hohe Konzentrationen in Guangzhou, China gemessen. Hier lagen die Konzentrationen für BDMA, ATMA und DDMA bei  $3,6 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  TS,  $8,3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  TS und  $156 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  TS [62].

#### 2.2.4.3 Konzentration in Oberflächengewässern

Unterschiedliche Studien für europäische, amerikanische und asiatische Oberflächengewässer zeigen, dass QACs hier im  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  Bereich vorhanden sind. In der bereits erwähnten österreichischen Umweltstudie lag die höchste Konzentration bei  $1,9 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  [57]. Höhere Konzentrationen für BDMA wurden in Taiwan im Bereich von 2,5 bis  $65 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  erfasst [63]. Für die USA liegen Werte von 2,7 bis  $5,8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  vor [64].

#### 2.2.4.4 Konzentration in Sediment

QACs haben, ähnlich wie bei Klärschlamm, auf Grund ihrer positiven Ladung eine hohe Adsorptionsaffinität für Sedimentpartikel. Haupteintragsweg von QACs in Sedimente ist vermutlich der Kläranlagen-Ablauf, aber auch *runoff*-Effekte durch die Verwendung von Wirtschaftsdünger in der Nähe von Fließgewässern sind denkbar. Für BDMA-C12 und DDMA-C18 wurden Höchstkonzentrationen von  $3,6 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  und  $2,1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  in Österreich gemessen. BDMA-C14 und

BDMA-C16 wurden sogar mit mittleren Konzentrationen von über  $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  erfasst [58, 59]. Messungen in den USA ergaben für BDMA Konzentrationen von 22 bis  $206 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  [64]. Durch den Adsorptionsvorgang sind QACs nicht mehr biologisch verfügbar und unterliegen auch im aeroben Bereich keinem weiteren Abbau, was auf eine Anreicherung dieser Substanzen schließen lässt.

#### 2.2.4.5 Konzentrationen in Gülle und Wirtschaftsdüngern

Die Datenlage zur Erhebung von Belastungen an QACs in Wirtschaftsdünger und Gülle ist sehr dürftig. Das österreichische Umweltbundesamt und das Umweltinstitut Wien haben 2007 eine erste umfangreiche Studie veröffentlicht zum Nähr- und Schadstoffgehalt in Gärückständen. In der Studie wurden sechs Biogasanlagen im Landkreis Vorarlberg untersucht. Untersucht wurden die Gärreste der Anlage, welche als Wirtschaftsdünger verwendet werden. Hierbei wurden von DDMA-C10, bis DDMA-C18, von BDMA-C12 bis BDMA-C18 und von ATMA-C12 bis ATMA-C16 Mengen in Konzentrationsbereichen bis  $119 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  nachgewiesen. Im Mittel lagen die Konzentration zwischen  $0,041 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  und  $2,2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Die höchsten Werte wurden für die Benzyl-Alkyl-Ammoniumverbindungen festgestellt, die teilweise im ökotoxikologischen relevanten Bereich lagen [65].

#### 2.2.5 Stoffauswahl der QACs

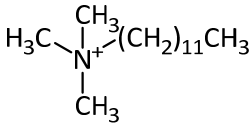
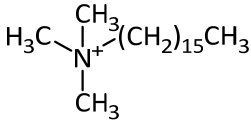
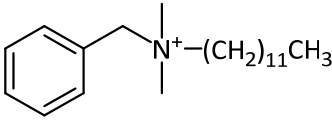
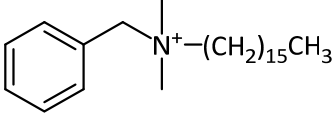
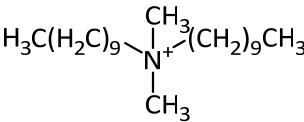
Die Länge der hydrophoben Alkylketten verursacht eine gewisse Spezifität der antimikrobiologischen Wirkung der QACs. Dabei haben QACs mit einer hydrophoben Alkylkette von  $n=12-14$  eine hohe biozide Wirkung gegen gram-positive Bakterien. QACs mit einer hydrophoben Alkylseitenketten von  $n=14-16$  haben hingegen eine hohe antimikrobiologische Aktivität gegen gram-negative Bakterien. QACs mit hydrophoben Alkylketten von  $<n=4$  oder  $>n=18$  haben keinen antimikrobiologischen Effekt [4, 9, 10]. Effekte auf Archaeen sind bisher nur unzureichend in der Literatur beschrieben [13]. Neben den bei fakultativen anaeroben Vergärung beteiligten gram-positiven und gram-negativen Mikroorganismen sind für die Methanbildung Archaeen zuständig. Diese weisen, abweichend zu normalen Bakterien eine andere Zellwand auf. Der antimikrobielle Effekt von QACs gegenüber Archaeen [67] ist nicht wirklich erforscht. Des Weiteren ist der Effekt der QACs auf die extrazellulären Enzyme, welche in anaeroben Mischkulturen die Hydrolyse der höhermolekularen Substratbestandteile durchführen, unklar. Neben der Struktur-Wirkungsbeziehung bezogen auf die Länge der Alkylseitenketten ist auch die Anzahl der hydrophoben Ammoniumsubstituenten wichtig. In akute Toxizitätstest mit *Photobacterium* sank die Toxizität signifikant mit der steigenden Anzahl der hydrophoben Seitenketten [68]. Jing et al. [69] zeigten anhand von quantitativen Struktur-Wirkungs-Beziehungstests (engl. *quantitative structure-activity relationship* (QSAR)) mit *Chlorella pyrenoidosa* und *Scenedesmus quadricauda*, dass die akute Toxizität hauptsächlich mit der

Kettenlänge und nicht der Anzahl an hydrophoben Substituenten steigt [69]. Die Benzyl-Alkyl-Ammonium-Ionen gelten als gut abbaubar unter aeroben Bedingungen, besitzen aber keine hohe Selektivität in ihrer bioziden Wirkung [14, 15].

Für die vorliegende Arbeit wurden fünf verschiedene QACs ausgewählt und getestet. Hierbei wurde sowohl darauf geachtet, dass die Selektivität der Seitenketten als auch die zusätzlichen Substituenteneffekte wissenschaftlich erfassbar sind. Demnach wurden Monoalkyl-Ammonium-Ionen mit C12 und C16 Alkylrest, Benzyl-Alkyl-Ammonium-Ionen ebenfalls mit C12 und C16 und Dialkyl-Ammonium-Ionen mit C10 getestet. Die Strukturformeln, die Abkürzungen und der Namen sind in der Tabelle 2.2-3 dargestellt.

Neben der Selektivität sollten die untersuchten Substanzen praxisrelevant und somit in gängigen Handelsprodukten vorhanden sein, was bei den genannten Substanzen der Fall ist (siehe hierzu Anhang, 13. Liste der DVG). Des Weiteren sollten, sofern möglich, bereits Literaturwerte zu Konzentrationen in Umweltproben wie Abwasser, Böden, Biogasanlagen o.ä. vorhanden sein, um praxisnah, reale potenzielle Effekte oder Belastungen durch diese Substanzen nachweisen zu können.

**Tabelle 2.2-2 QACs:** Strukturformel, Name und Abkürzung der getestete quaternären Ammoniumverbindungen

Name	Strukturformel	Abkürzung
Dodecyltrimethylammonium		ATAC-C12
Hexadecyltrimethylammonium		ATAC-C16
Benzyltrimethyldodecylammonium		BDMA-C12
Benzyltrimethylhexadecylammonium		BDMA-C16
Didecyltrimethylammonium		DDMA-C10

## 2.3 Grundlagen der Biogaserzeugung

Im nachfolgenden Kapitel werden die Grundlagen der Biogaserzeugung kurz erklärt. Dabei wird zuerst der anaeroben Abbau und anschließend der technischen Umsetzung sowie wichtigen Prozessgrößen erklärt.

### 2.3.1 Anaerober Abbau

Der Abbau von organischen Stoffen (Biopolymere) unter anaeroben Bedingungen unterliegt einem vierstufigen Prozess. Größere Biopolymere werden sukzessiv zu den beiden Endprodukten Methan ( $\text{CH}_4$ ) und Kohlendioxid ( $\text{CO}_2$ ) abgebaut. Dabei unterscheidet man vier Abbaustufen: Hydrolyse, Acidogenese, Acetogenese und Methanogenese. Innerhalb dieser Stufen sind vorwiegend drei verschiedene Bakterienstämme beteiligt: Fermentative (Säurebildner), Acetogene (Wasserstoffbildner) und Methanogene (Methanbildner). Eine schematische Darstellung des vierstufigen Prozesses ist in Abbildung 2.3-1 wiedergegeben. Die einzelnen Stufen werden in 2.3.1.1 bis 2.3.1.4 erörtert [71]–[75].

#### 2.3.1.1 Enzymatische Hydrolyse

Die Aufspaltung von langkettigen, meist unpolaren Polymeren wie Fette, Kohlenhydrate und Eiweiße erfolgt in kleinere Polymere durch extrazelluläre Enzyme. Diese Umwandlung bewirkt vor allem eine zunehmende Wasserlöslichkeit der Substrate, welches die Grundvoraussetzung für die weiterführenden Stoffwechselschritte ist. Hierbei sollte der pH-Wert im leicht alkalischen Bereich liegen [72, 74].

#### 2.3.1.2 Acidogenese

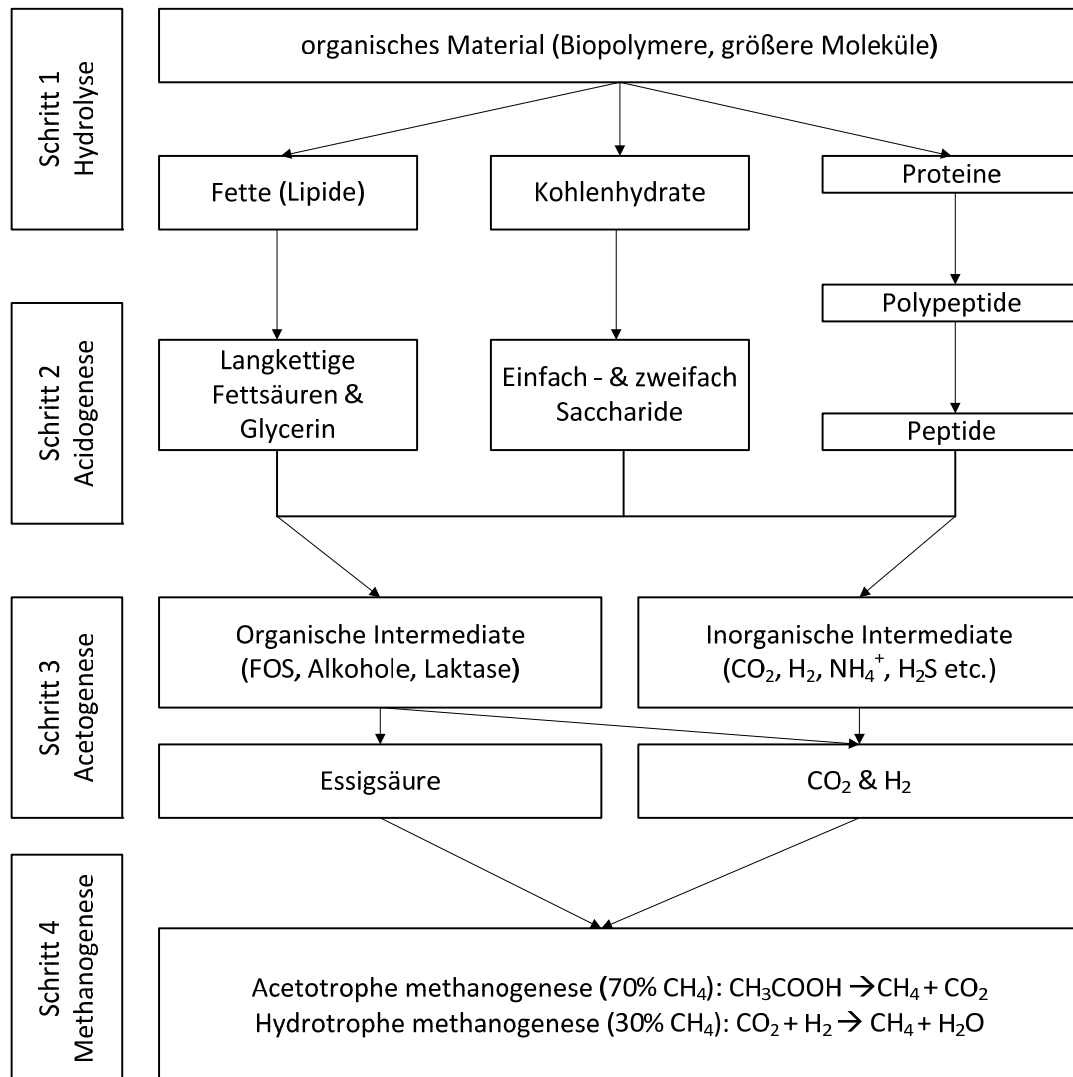
Die gelösten Substrate werden in der Acidogenese (Versäuerungsphase) durch verschiedene fakultative und obligat-anaerobe Bakterienarten in noch kürzere organische Zwischenprodukte wie Fettsäuren (siehe Kapitel 2.3.3.5) und Alkohole gespalten. Dabei entsteht sowohl  $\text{CO}_2$  als auch  $\text{H}_2$ . Bevorzugt laufen diese Reaktionen bei einem pH-Wert von kleiner als pH 7 ab [72, 74].

#### 2.3.1.3 Acetogenese

Bei der Acetogenese werden die bereits gebildeten organischen Zwischenprodukte aus der Versäuerungsphase durch synthrophe acetogene Bakterien in Essigsäure bzw. Acetat umgewandelt. Die anorganischen Zwischenprodukte  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2$  werden durch homoacetogene Bakterien zu Acetat verstoffwechselt. Die Acetogenese muss aus reaktionskinetischen Gründen zusammen mit der Methanogenese ablaufen [72, 74].

#### 2.3.1.4 Methanogenese

Über zwei unterschiedliche Stoffwechselwege werde die Zwischenprodukte Acetat,  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2$  zu Methan umgewandelt. Die hydrogenotrophen Methanogene wandeln die Zwischenprodukte  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2$  reduktiv zu Methan um. Wohingegen die acetoclastischen Methanogene die Acetat zu Methan und  $\text{CO}_2$  umwandelt [72, 74].

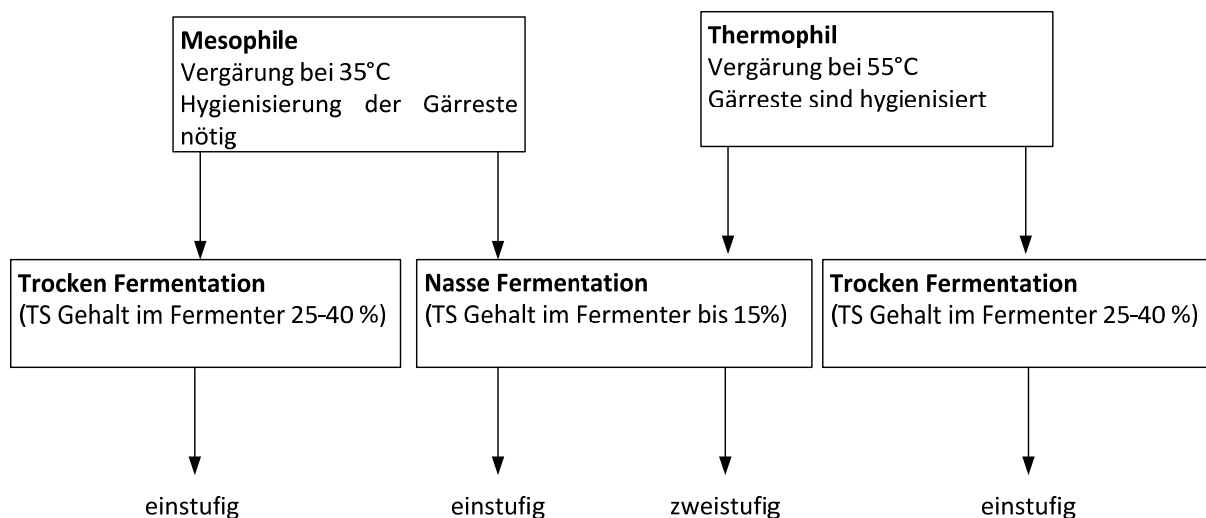


**Abbildung 2.3-1 Anaerober Abbau:** Vierstufiger anaerober Abbauprozess von organischer Stoffen zu Methan, Kohlendioxid und ggf. Wasser (in Anlehnung an [74]).

#### 2.3.2 Biogasanlagen

In der Praxis gibt es unterschiedliche Verfahrensweisen, um aus Biomasse das gewünschte Biogas zu erhalten. Dabei gibt es unterschiedliche Einteilungen der Fermenter. Aus verfahrenstechnischer Sicht würde man in einstufige, zweistufige und mehrstufige Prozesse unterteilen. Darüber hinaus gibt es die Einteilung in Flüssigvergärung oder Trockenvergärung; mesophil oder thermophil (siehe Abbildung 2.3-2). Die Prozesse werden in diskontinuierliche, quasikontinuierliche und

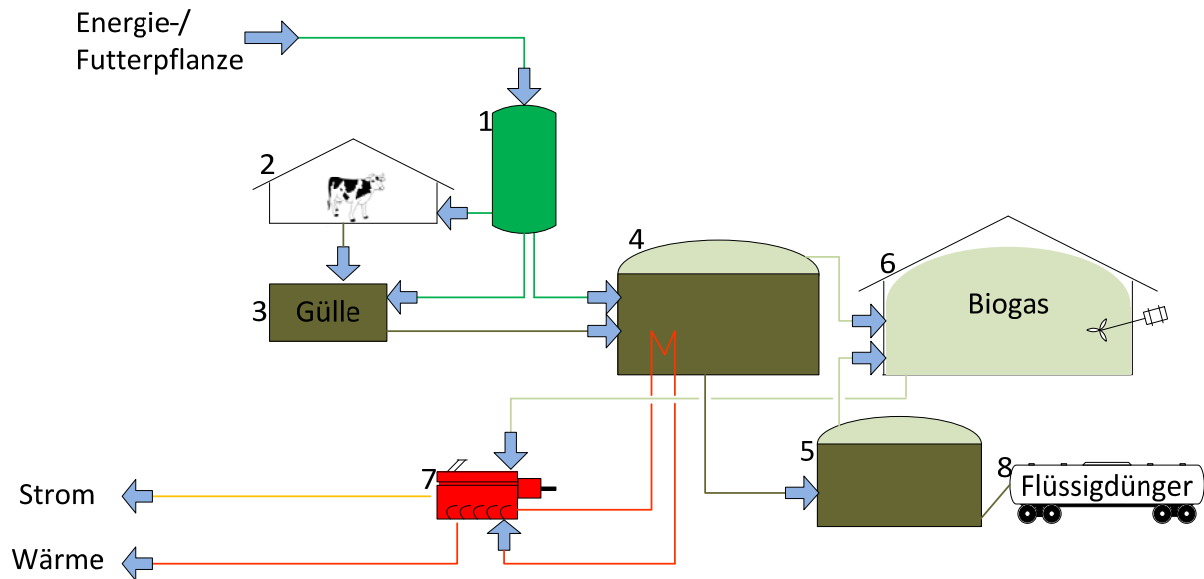
kontinuierliche Verfahren unterteilt. Die Fütterungsart wird in Güllevergärung, Co-Vergärung und Mono-Vergärung aufgegliedert. Darüber hinaus kann noch instehende oder liegende Reaktorbauarten unterteilt werden. Bei der Unterteilung der Verfahrensstufen in ein-, zwei oder mehrstufige versucht man anhand einer räumlichen Trennung die einzelnen Abbaureaktionen voneinander zu trennen und so für die jeweiligen Mikroorganismen spezifisch optimale Bedingungen einzustellen. Diese Verfahren sind besonders gut geeignet, um quasikontinuierlich oder kontinuierliche Fütterungen durchzuführen. Einstufige Verfahren können auch als Batch-Vergärung betrieben werden und sind somit diskontinuierliche Verfahren. Diese werden einmal beladen und nach Ablauf der Vergärung komplett entleert. Bei quasikontinuierlichen und kontinuierlichen Systemen wird nicht nur dauerhaft oder chargenweise der Fermenter beladen, sondern es erfolgt auch eine kontinuierliche Gasproduktion und es stellt sich oft eine hohe Prozessstabilität ein. Dabei erfolgt die Substratumsetzung in einem quasi-kontinuierlichen System mit einer Durchflussspeicheranlage.



**Abbildung 2.3-2 Verfahrenskombinationen:** Mögliche Verfahrenskombinationen bei der Erzeugung von Biogas (angelehnt an [71]).

Die am häufigsten in der Landwirtschaft verbreitete Bauart ist die einstufige Co-Vergärung, welche quasi-kontinuierlich mit Speicherdurchflusssystemen im mesophilen Bereich (37°C bis 43°C) betrieben wird [73, 77]. Nachwachsende Rohstoffe sind in Deutschland die am häufigsten eingesetzten Substrate (52 % massebezogen und 79 % energiebezogen) und innerhalb der Gruppe der Nachwachsenden Rohstoffe ist Mais bzw. Maissilage das meist verwendete Substrat (72 % massebezogen und 73 % energiebezogen) [77].





**Abbildung 2.3-3 Biogasanlage:** Fließbild einer Landwirtschaftlichen Biogasanlage, 1 Silo mit z.B. Maissilage, 2 Kuhstall, 3 Güllevorlage, 4 Fermenter, 5 Nachgärer, 6 Biogasspeicher, 7 Blockheizkraftwerk, 8 Gällerestespeicher (angelehnt an [73, 79]).

Gülle und Substrat werden kontinuierlich oder diskontinuierlich in den Fermenter (Abbildung 2.3-3, 4) gepumpt und dort gemeinsam vergärt. Das entstehende Biogas gelangt in den Biogasspeicher, welcher neben einer robusten Außenhaut aus einem flexiblen Gassack besteht. Das fermentierte Substrat gelangt in den Nachgärer (Abbildung 2.3-3 Punkt 5). Da auch hier noch Biogas gebildet werden kann, wird dieses abgefangen und in den Gasspeicher eingeleitet. Anschließend werden die Gärreste in ein Speicherbecken oder Güllefaß abgepumpt und als Wirtschaftsdünger eingesetzt. Das entstandene Gas wird aus dem Gasspeicher in einem Blockheizkraftwerk (BHKW) verstromt. Der entstehende Strom wird ins Energienetz eingespeist. Entstehende Wärme wird zum Heißen des Fermenters verwendet und sofern vorhanden in ein Nahwärmenetz eingebracht.

### 2.3.3 Wichtige Prozessparameter des anaeroben Abbaus

Die Grundlage einer stabilen Prozessführung ist das Erfassen (kontinuierlich oder semikontinuierlich) von klassischen physikalischen und chemischen Größen wie Temperatur und pH-Wert. Diese werden sowohl in Kläranlagen als auch in Biogasanlagen meist nicht nur erfasst, sondern als Bezugsgröße im Mess- und Steuerungssystem verwendet [79]. Weitere prozessspezifischere Parameter benötigen meist aufwendigere Analysen und werden nicht kontinuierlich bestimmt. Sie geben aber unverzichtbare Informationen zum ablaufenden Prozess. Hierzu zählen besonders die flüchtigen Fettsäuren (FOS), welche in Praxis aktuell meistens noch nicht online ermittelt werden können und noch kostenintensiv sind.

### 2.3.3.1 Trockensubstanz

Die Trockensubstanz (TS) und die organische Trockensubstanz (oTS) sind wichtige Messgröße in der heutigen Biogasproduktion [80]. Sie dienen als Bezugsgrößen für andere Parameter wie Stickstoff- und Proteingehalt. In der Praxis wird ein TS-Gehalt von 8 bis 10 % angestrebt. Ein höherer TS-Gehalt führt zu einer stärkeren Belastung des Rühr- und Pumpwerkes. Ein geringerer TS-Gehalt ist zwangsläufig mit einer Unterfütterung und somit einer zu geringeren Auslastung der Anlage verbunden. Der TS-Gehalt bezeichnet hierbei die Konzentration an Feststoff, welche durch Filtration oder Zentrifugation zurückbleibt und bei 105°C getrocknet wird, bezogen auf das vorher gemessene gesamt Volumen [81]. Bei der oTS handelt es sich um den organischen Anteil, der auf den TS-Gehalt bezogen wird. Hierfür wird im Anschluss an die TS-Bestimmung der Tiegel erst auf 200°C (Zwischenwägung) und anschließend auf 550°C ausgeglüht (Endwägung). Eine online-Bestimmung des TS und des oTS sind quasi nicht möglich.

### 2.3.3.2 pH-Wert

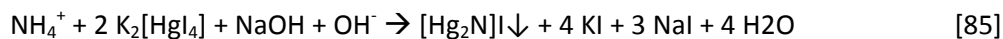
Der pH-Wert spielt eine wesentliche Rolle bei der Aktivität der Mikroorganismen. In der Regel sollte der pH-Wert zwischen 6,8 und 8 liegen. In der Praxis findet man allerdings auch pH-Werte zwischen 6,5 und 9. Obwohl der pH-Wert aufgrund der Trägheit und der Pufferkapazität des Systems kein optimaler Kontroll- und Steuerungsparameter ist, können grob Trends im Gesamtprozess erkannt werden. Zusätzlich ist die Messtechnik in der Praxis gut etabliert und lässt sich sowohl atline als auch online und inline durchführen.

### 2.3.3.3 FOS/TAC

Das FOS/TAC (TAC=totaler anorganischer Carbonat) Verhältnis gibt über die biochemischen Bedingungen im Reaktor weitaus bessere Aussagen als der pH-Wert. Allerdings variiert er sehr stark von Anlage zu Anlage und von Messmethode zur Messmethode. Ein Biogasprozess mit FOS/TAC-Werten von unter 0,4 gilt als stabil. Hingegen sind FOS/TAC-Werte von 0,4 bis 0,8 ein erstes Anzeichen für eine Störung der Biogasproduktion [72]. Die kostengünstigste und simpelste analytische Bestimmungsmethode für diesen Parameter ist die Titration. Diese wird fast ausschließlich atline oder offline durchgeführt. Vereinzelte Online-Umsetzungen der FOS/TAC-Titrationsen gibt es bereits [83, 84].

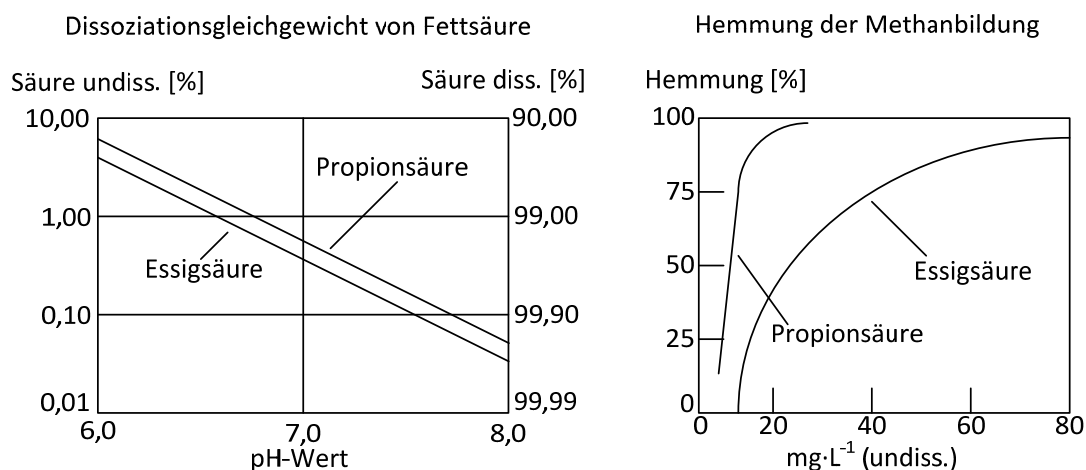
#### 2.3.3.4 Ammoniumstickstoff (NH<sub>4</sub>-N)

Der Ammoniumstickstoff wird durch Abbau von proteinhaltigen Substraten durch die Aktivität von Enzymen erzeugt. Dies kann bei erhöhten Konzentrationen an Ammonium (>3 g·L<sup>-1</sup>) zu Hemmungen der Biogasproduktion führen und muss vermieden werden [77, 79]. Die Analyse des NH<sub>4</sub>-N-Gehaltes erfolgt spektroskopisch nach dem Prinzip von Neßler [84] und wird meist mittels eines Komplettanalysesystems durchgeführt. Hierbei wird Kaliumtetraiodomercurat (II) K<sub>2</sub>[HgI<sub>4</sub>] alkalisch in Gegenwart von Ammoniak zu einem rotbraunen Farbkomplex [Hg<sub>2</sub>N]I umgesetzt. Der Nachweis des Komplexes erfolgt photometrisch.



#### 2.3.3.5 Flüchtige organische Säuren

Unter „flüchtige organische Säuren“ (FOS) versteht man Carbonsäuren mit einer Alkylkette von zwei bis sieben C-Atomen. Sie zählen zu den mittelstarken Säuren [76]. Im deutschsprachigen Raum hat sich die Bezeichnung flüchtige organische Säuren etabliert. In englischsprachiger Literatur überwiegt die Bezeichnung *volitale fatty acids*, abgekürzt (VFA). Die Bezeichnung *short chain fatty acids* (SCFA) und *free fatty acids* sind ebenfalls zu finden [76]. Letzteres kann auf die Bestimmung mittels Gaschromatographie (GC) zurück geführt werden, da FOS in der underivatisierten Form mittels GC bestimmt werden können und hier über das Headspaceverfahren als freie Säuren in die Gasphase übertreten. FOS sind die wichtigsten Intermediate der anaeroben Vergärung und ein maßgeblicher Indikator für die Prozessstabilität des Reaktors. Eine FOS-Anreicherung im Reaktor lässt auf einen nicht stabilen Prozess schließen, da die gebildeten Säuren nicht weiter metabolisiert werden. Steigende Konzentrationen hemmen die Mikroorganismen, was bis zum Erliegen des Prozesses führen kann. Dies wird bei gleichzeitigem Absinken des pH-Wertes unterstützt. Bei frischer Gülle liegt die Konzentration an FOS bei 3-10 g·L<sup>-1</sup>. Bei vergorener Gülle liegt diese um 1 g·L<sup>-1</sup>. Da die Mikroorganismen gegenüber den Säuren eine hohe Adaptionsfähigkeit besitzen, ist eine allgemeine Aussage über kritische Hemmkonzentrationen schwer zu bestimmen. Sie ist oft substrat- und anlagenspezifisch. Ab FOS Konzentrationen von über 2 g·L<sup>-1</sup> ist allerdings mit einer Abnahme der Biogasproduktion zu rechnen. [73, 81]. Ab Konzentrationen von über 10 g·L<sup>-1</sup> gelten Reaktoren als überlastet. Dies macht sich auch im Absinken des pH-Wertes bemerkbar. Da davon ausgegangen wird, dass die undissoziierten Säuren einen stärkeren Hemmeffekt ausüben als die dissoziierten, hat eine hohe Konzentration an Säuren mit einem gleichzeitigen Absinken des pH-Wertes einen synergistischen Effekt [73, 77].



**Abbildung 2.3-4 FOS:** Zusammenhang des pH-Wertes und der Dissoziationsform und der Hemmung der Methanbildungsrate [76].

Dies zeigt deutlich, dass die Bestimmung des pH-Wertes zwar ein wichtiger Parameter ist, aber keine ausreichende Aussage darüber treffen kann, ob der Prozess stabil oder instabil abläuft. Dies kann durch die Bestimmung des FOS/TAC Verhältnisses deutlich besser erfasst werden. Allerdings ist der FOS/TAC Wert eine Vergleich von zwei Summenparametern. Dies kann nur bedingt Auskunft über die mikrobiologischen Prozessvorgänge geben. Detaillierte Prozessinformationen soll die Bestimmung der einzelnen flüchtigen organischen Fettsäuren liefern, was teilweise Gegenstand dieser Arbeit ist. Es ist anzunehmen, dass die Anreicherung von Fettsäuren nicht die Ursache von Prozessstörungen sind, sondern dass sie als Indikator für eine Prozessstörung herangezogen werden sollten. Für die Bestimmung der in Tabelle 2.3-1 angegebenen Fettsäuren müssen chromatographische Trennmethoden etabliert werden. In der Vergangenheit wurde häufig die Gaschromatographie herangezogen [87, 88]. Als kostengünstiger und praktikabler haben sich aber flüssigchromatographische Systeme wie Ionenchromatographie und Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie (HPLC) erwiesen, welche unter 2.4.2 und 2.4.3 genauer beschrieben werden.

**Tabelle 2.3-1 FOS:** Auflistung der flüchtigen organischen Säuren, welche im Biogasprozess eine Rolle spielen

Name	IUPAC Bezeichnung	Formel	pKs-Wert	SdP (°C)
Essigsäure	Ethansäure	$C_2H_4O_2$	4,76	118
Propionsäure	Propansäure	$C_3H_6O_2$	4,87	141
iso-Buttersäure	2-Methyl-Propansäure	$C_4H_8O_2$	4,86	155
Buttersäure	Butansäure	$C_4H_8O_2$	4,82	164
iso-Valeriansäure	3-Methyl-Butansäure	$C_5H_{10}O_2$	4,79	176
Valeriansäure	Pentansäure	$C_5H_{10}O_2$	4,84	184
Capronsäure	Hexansäure	$C_6H_{12}O_2$	4,85	206

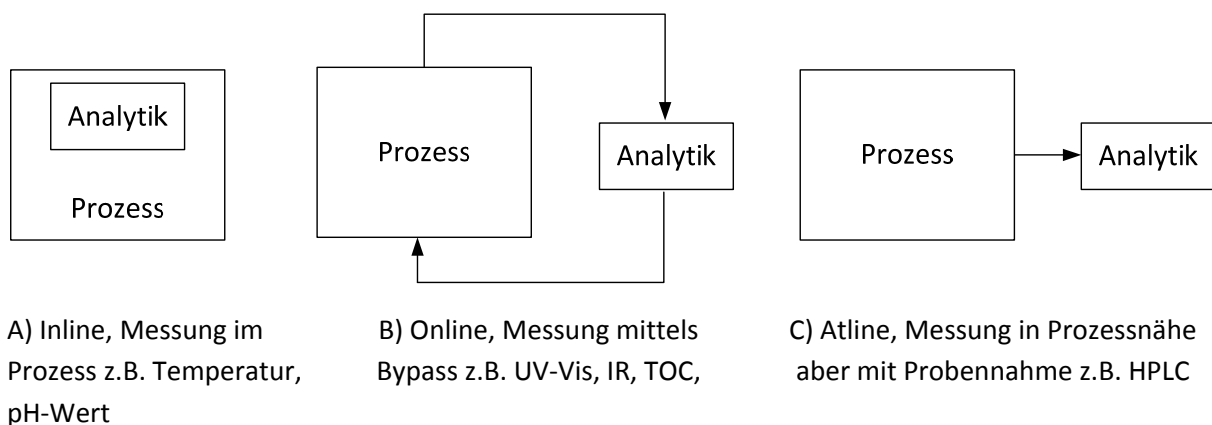
SdP=Siedepunkt

## 2.4 Prozessanalytik und analytische Methoden

Das folgende Kapitel soll einen Überblick zum Stand der Prozessanalysetechnik und den in dieser Arbeit verwendeten analytischen Methoden und Verfahren bieten.

### 2.4.1 Prozessanalytik

Prozessanalytik (PRA) und Prozessanalysetechnik (PAT) ist ein Themenfeld der analytischen Chemie, das sich mit chemischen oder biochemischen Prozess beschäftigt. Das Themenfeld der PAT umfasst dabei nicht nur einfache physikalische Messtechniken wie Druck, Temperatur, Redoxpotential, Leitfähigkeit und pH-Wert, sondern auch moderne Verfahren aus dem Bereich der instrumentellen Analytik wie Chromatographie, Spektroskopie, Spektrometrie und Sensorik [89, 90]. Neben den unterschiedlichen Methoden unterteilt man die PRA/PAT in vier unterschiedliche Verfahren: inline, online, atline und offline (engl. *in-line*, *on-line*, *at-line* und *off-line*) wie in Abbildung 2.4-1 zu sehen ist [79].



**Abbildung 2.4-1 Prozessanalytik:** Schematische Darstellung der 3 unterschiedlichen PRA Verfahrensweisen [79].

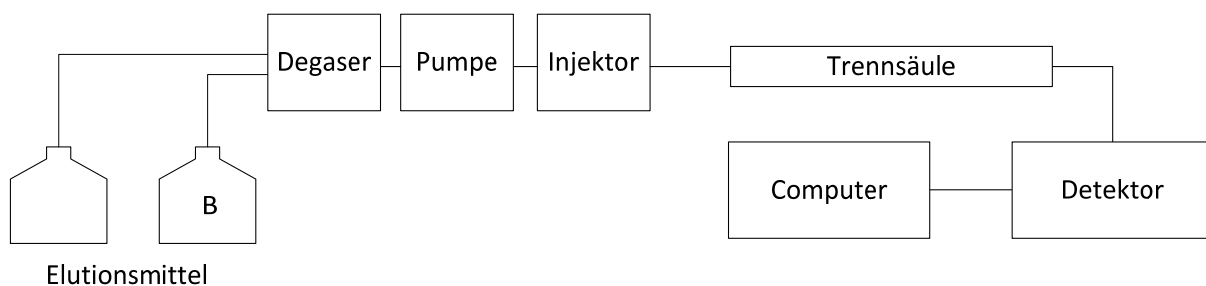
In- und online-Messtechniken ermöglichen es, schnelle und kostengünstige Messdaten zu erheben, welche im Idealfall für die Steuerung und Regelung des Prozesses verwendet werden können. Hierbei werden vor allem mit einfache Messmethoden Parameter wie Temperatur, pH-Wert oder UV-Vis Daten bestimmt. Online-Verfahren mittels HPLC oder Massenspektrometrie bilden auf Grund ihrer Komplexität, mangelnden Prozessschnittstellen und notwendigem hohen Betreuungsgrad die Ausnahme. Ihr Einsatz ist immer dann erforderlich, wenn substanzspezifische Informationen benötigt werden und einzelne Summenparameter o.ä. nicht ausreichen [89, 91, 92]. Biogasprozesse werden meist doch offline oder atline Analysen überwacht. Erste Ansätze zur online Bestimmung von prozessrelevanten Parametern in der Flüssigphase (z.B. FOS/TAC) [82] gibt es bereits. Online und inline Verfahren zur Bestimmungen der Gaszusammensetzung sind bereits Standard [92]–[94].

### 2.4.2 Hochleistung-Flüssigkeits-Chromatographie

Die Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC) ist eine weit verbreitete Analysemethode zur qualitativen sowie quantitativen Analyse von löslichen Stoffgemischen und wird wie die Dünnschichtchromatographie und die Gaschromatographie als Trennverfahren eingesetzt. Die HPLC deckt dabei ein sehr breites Spektrum an möglichen Analyten ab. Es können sowohl ionische, polare als auch unpolare Substanzen analysiert werden. Hauptvoraussetzung ist, dass sie in einem wässrigen oder organischen Lösemittel vollständig löslich sind. Grund für die hohe Flexibilität der HPLC sind zum einen eine hohe Anzahl an unterschiedlichen Trennsäulenmaterialien welche je nach Fragestellung spezifisch ausgewählt werden können und zum anderen die Vielzahl an unterschiedlichen Detektoren. Gängige Detektoren sind:

- UV-Vis (spezifisch für eine Wellenlänge)
- DAD (Dioden-Array Detektor)
- Brechungsindex Detektor (engl. *refraction index detector*, RI)
- Leitfähigkeitsdetektor
- Fluoreszenzdetektor
- Massenspektrometer (MS)

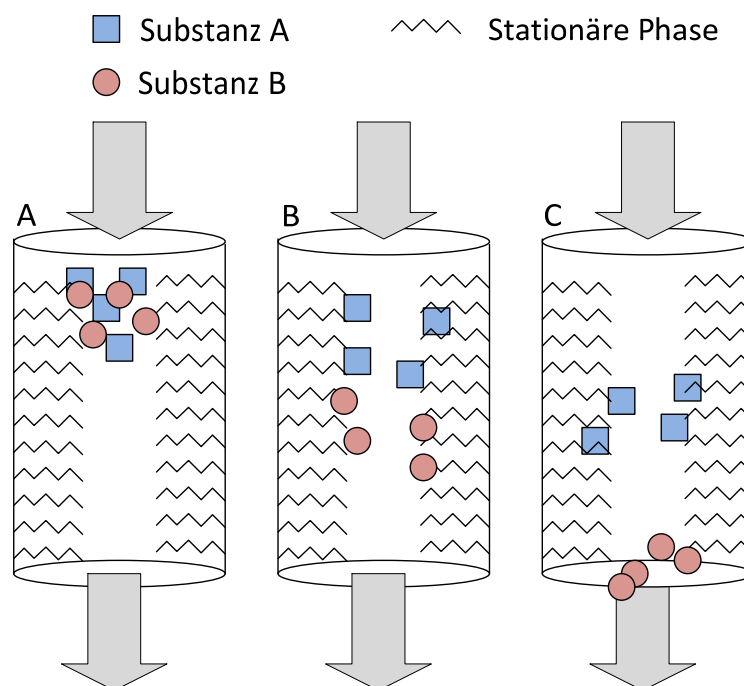
Das Elutionsmittel (mobile Phase) wird hierbei über eine Doppelkolbenpumpe angesaugt, durch den Entgaser (engl. *degaser*) in die Pumpe gefördert und anschließend weiter zum Injektor gepumpt. Im Injektor wird die Probe durch ein 6-Wegeventil in den Elutionsstrom injiziert. Die mobile Phase und die Probe gelangen so gemeinsam zur Trennsäule, in der die einzelnen Analyten unterschiedlich stark mit dem Trennmaterial der Säule (stationäre Phase) wechselwirken. Dies führt zu einer Auftrennung der einzelnen Analyten und einer sukzessiven Detektion der Einzelsubstanzen im Detektor. Der schematische Aufbau eines HPLC Systems ist in Abbildung 2.4-2 dargestellt [95].



**Abbildung 2.4-2 HPLC Fließbild:** Blockfließbild des Aufbaus eines HPLC Gerätes mit Niederdruck-Gradient-System

### 2.4.2.1 Chromatographische Auftrennung

Grundprinzip der Chromatographie ist das Auftrennen eines Stoffgemisches in seine einzelnen Analyten. Der eigentliche Trennvorgang findet dabei in einer Trennsäule statt, in der die Analyten sich zwischen mobiler Phase (Eluent) und stationärer Phase (Säulenmaterial) verteilen und mit der stationären Phase in Wechselwirkung treten. Je nach physiko-chemischer Eigenschaft der Analyten besitzen diese eine höhere oder niedrigere Affinität zum Trägermaterial der stationären Phase und verweilen somit länger oder kürzer am Trägermaterial. Abbildung 2.4-2 zeigt diesen Vorgang im Einzelnen. Substanz A hat hier eine höhere Affinität zu stationären Phase als Substanz B und verbleibt länger auf der Trennsäule. Am Ende (C) sind Substanz A und B vollständig voneinander getrennt [96].



**Abbildung 2.4-3 Retentionsvorgang:** Schematische Darstellung der chromatographischen Auftrennung in einer Trennsäule (in Anlehnung an [96])

Das Wechselspiel der Moleküle zwischen stationärer und mobiler Phase wiederholt sich im gesamten chromatographischen Lauf und wird durch den Verteilungskoeffizienten ( $K$ ) beschrieben:

$$K = \frac{c_{sta.}}{c_{mob.}}$$

**Formel 2.4-1**

Wie in Abbildung 2.4-3 zu sehen, treten die einzelnen Moleküle zwar beide aus der Säule aus, dies geschieht allerdings nicht zeitgleich. Gründe dafür sind das Strömungsprofil des Eluenten, Längsdiffusionen der Moleküle in der Säule und die unterschiedliche Wegstrecke, die die Moleküle

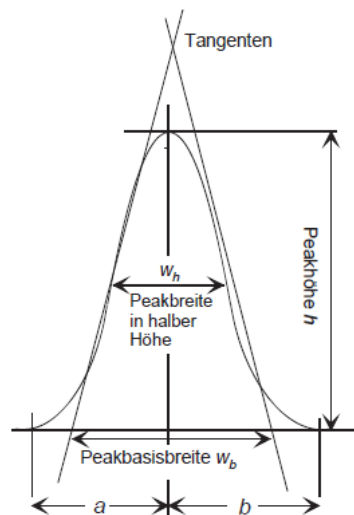
zurücklegen (sog. Eddy-Diffusion). Das resultierende Signal am Detektor bekommt somit eine gaußförmige Form und wird Peak genannt. Aus dem Peak lassen sich Kenngrößen ableiten, welche zur Beurteilung der chromatographischen Trennung wichtig sind [97]. Wichtige Größen sind:

- Peakhöhe  $h$
- Peakbreite in halber Höhe  $w_h$
- Peakbasisbreite  $w_b$
- Retentionszeit  $t_R$

Hieraus lässt sich die Auflösung ( $R$ ) zweier nebeneinander liegender Peaks berechnen. Eine optimale Trennung gilt als gegeben, wenn  $R \geq 1,5$  ist. Der mathematische Zusammenhang ist wie folgt definiert:

$$R = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_{b1} + w_{b2}}$$

Formel 2.4-2



**Abbildung 2.4-4 HPLC-Peak:** Darstellung eines gaußförmigen Peak und dessen Kenngrößen [98].

Bei der chromatographischen Trennung kann es aufgrund der oben beschriebenen Wechselwirkungen zu sogenannten Peakverbreiterung kommen. Dieses Phänomen wird im Wesentlichen durch drei Effekte hervorgerufen und wird anhand der van Deemter-Gleichung beschrieben [99]:

- a) Eddy-Diffusion: In gepackten chromatographischen Säulen wandern die Analytmoleküle nicht linear durch die Säule, sondern zick-zack. Dies führt zu einem Verbreitern des Peaks, da die Moleküle unterschiedlich schnell wandern. Dieser Effekt ist von der Fließgeschwindigkeit unabhängig (orange Linie, A).
- b) Längsdiffusion: Hier wandern die Analytmoleküle in der mobilen Phase vor und zurück, was ebenfalls zu einer Peakverbreiterung führt. Dieser Effekt wird bei steigender Fließgeschwindigkeit geringer (rote Linie, B/v).



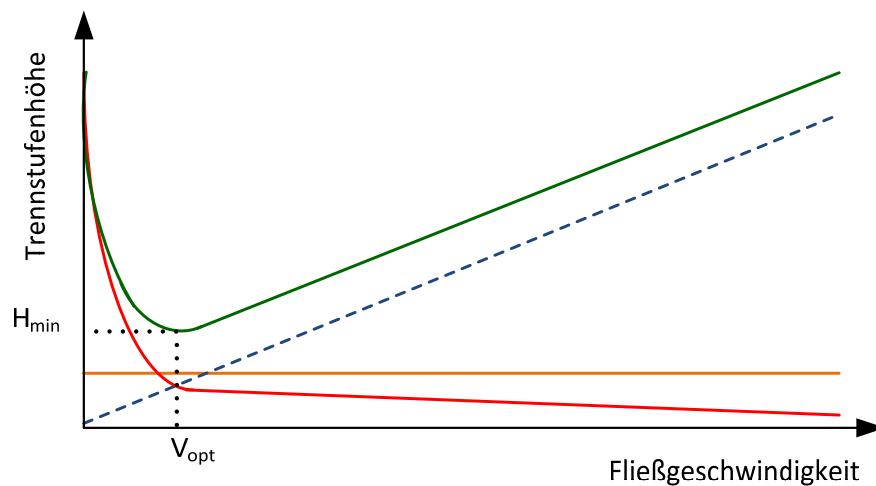
- c) Massenübergang: Der Massenübergang der Analyten von mobiler zu stationärer Phase führt ebenfalls zu einer Peakverbreiterung. Je schneller die Fließgeschwindigkeit desto höher die Trennstufenhöhe. Dieser Vorgang ist linear zur Fließgeschwindigkeit (blau gestrichelte Linie,  $C \cdot v$ ).

Alle drei Terme sind in der Van-Deemter-Gleichung enthalten:

$$H = A + \frac{B}{v} + C \cdot v$$

**Formel 2.4-3**

Aus der resultierenden Hyperbelfunktion ergibt sich das Minimum bei dem die Strömungsgeschwindigkeit optimal ist [99].



**Abbildung 2.4-5** Van-Deemter-Diagramm: Abbildung der Zusammenhänge von Eddy-Diffusion (orange) Längsdiffusion (rot), Massenübergang (gestrichelt) und der resultierenden Van-Deemter-Kurve [99]

#### 2.4.2.2 Umkehrphasenchromatographie

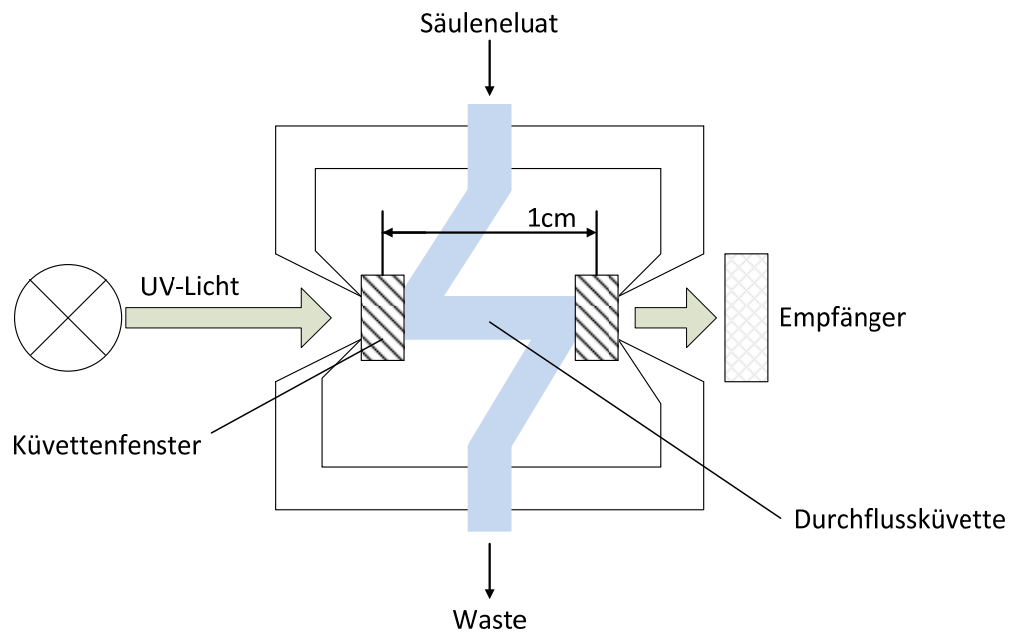
Die Umkehrphasenchromatographie (engl. *reversed phase HPLC*, RP-HPLC) ist die am weitesten verbreitete HPLC Methode. Es handelt sich dabei um chemisch modifizierte Silicagele. Dabei wird an der Silicaoberfläche die Silanolgruppe mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen modifiziert. Für hydrophobe RP-HPLC werden C8- oder C18-Trennphasen verwendet und mit polaren mobilen Phasen wie Wasser, Methanol oder Acetonitril eluiert. Hierbei unterscheidet man zwischen der isokratischen, in der die Zusammensetzung der mobilen Phase nicht verändert wird und der gradienten Elution, die sich durch wechselnde Lösemittelzusammensetzung auszeichnet. Die Auftrennung des Stoffgemisches basiert auf den unterschiedlichen Löslichkeiten der Analyten innerhalb der mobilen und stationären Phase. Hierbei gilt, dass polarere Analyten eine höhere Affinität zur mobilen Phase haben und somit früher eluieren.

#### 2.4.2.3 UV-Detektion

Für die HPLC ist die wohl am meisten verwendete Detektionsart die UV-Vis Detektion, welche natürlich die UV-Absorption der Analyten voraussetzt. Es können sowohl Einzelwellenlängen-Detektoren (engl. *fixed wavelength detectors* FWD oder auch nur UV-Detektor) als auch Gesamtspektren-Detektoren (diodes array detectors, DAD) verwendet werden. Um eine möglichst große Extinktion ( $E_\lambda$ ) und somit eine hohe Empfindlichkeiten zu erreichen, sollten gemäß Lambert-Beersches Gesetz die vorhandenen Multiplikatoren möglichst groß sein.

$$E_\lambda = \lg\left(\frac{I_0}{I_1}\right) = e_\lambda \cdot c \cdot d \quad \text{Formel 2.4-4}$$

Da der Absorptionskoeffizient ( $e_\lambda$ ) substanzspezifisch und die Konzentration ( $c$ ) ebenfalls vorgegeben ist, kann nur an der geometrischen Größe der Schichtdicke ( $d$ ) etwas verändert werden. Dies ist allerdings ebenfalls begrenzt, da mit größerer Schichtdicke auch ein größeres Volumen benötigt wird, was auf Grund der Eddy-Diffusion zu einer Peakverbreiterung führen würde. Bewährt haben sich Mikrodurchflusssküvetten mit einer Z-förmigen Durchflussskapillare, die in der Regel einen Lichtweg von 1 cm und ein Gesamtvolumen von 10 µL haben.



**Abbildung 2.4-6 UV-Detektorzelle:** Darstellung einer Mikrodurchflussküvette (in Anlehnung an [100]).

Beim dem Empfänger handelt es sich um eine oder mehrere Fotodioden, welche das durchdringende Licht detektieren. Im Aufbau eines Standard UV-Detektors befindet sich vor der Durchflussküvette ein Prisma oder ein optisches Gitter, welches es ermöglicht, nur eine Wellenlänge durch die Probe zu leiten. Als Empfänger fungiert eine Fotodiode, die die resultierende Lichtstärke misst. Beim DAD wird das komplette UV/Vis-Licht durch die Probe geschickt. Hinter der Probe wird dieses Licht z.B. durch ein Prisma aufgespaltet. Für die Erfassung des kompletten Spektrums werden dann mehrere Fotodioden benötigt, die das projizierte Spektrum aufzeichnen [100], [101].

### 2.4.3 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie (MS) hat sich durch die Einführung der Elektrospray-Ionisation (ESI) und die Nobelpreisarbeiten von John B. Fenn in den vergangenen 30 Jahren rasant entwickelt [102]. John Fenn gelang es, gelöste Moleküle in die Gasphase zu überführen. Dies ermöglichte die Kopplung von Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie, was heute als HPLC-ESI-MS bezeichnet wird. Die Kombination aus diesen beiden Messmethoden bietet eine Reihe von Möglichkeiten, die es vorher so nicht oder nur bedingt gab. Besonders geeignet ist sie für die Strukturanalyse von organischen Verbindungen, aber auch für die Quantifizierung von Stoffen in komplexen Matrices mit Nachweisgrenzen bis in den Nanogramm-Bereich kann sie eingesetzt werden. Das Herzstück des MS ist der Massenfilter, welcher die Zuordnung der Molekülionenmasse ermöglicht. Diverse Massenfilter sind erhältlich, die sich in der Bauart, Empfindlichkeit, Auflösung und Kosten unterscheiden:

- Quadrupol (Q)
- Orbitrap
- Sektrofeld (SF)
- Iontrap (Trap)
- Time of flight (TOF)

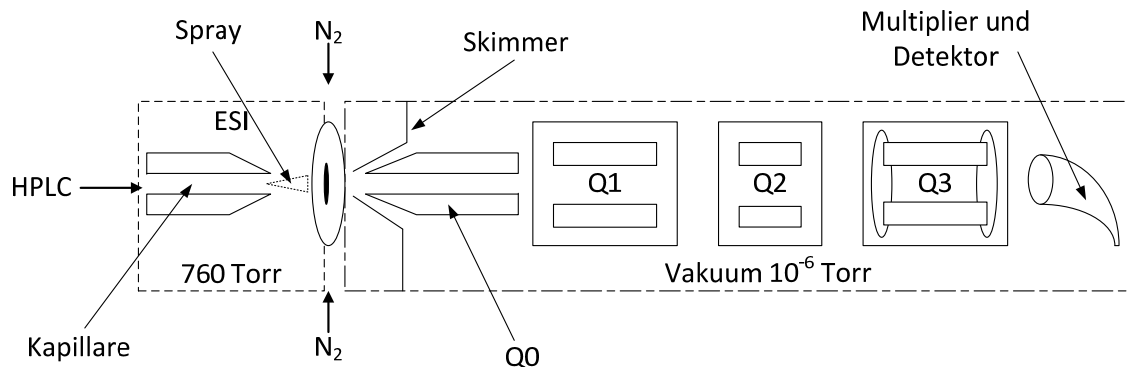
Der am weitesten verbreitete Massenfilter ist der Quadrupol-Massenanalysator, welcher auch schon bei klassischen GC-Kopplungen eingesetzt wurde. In den letzten Jahren hat sich darüber hinaus noch die Kombination aus in Reihe geschalteten Massenfiltern etabliert, was zu den Einführungen der sogenannten Tandemmassenspektrometrie führte. Gängige Abkürzungen sind hierbei LC-MS/MS, LC-MS-MS, LC-MS<sup>n</sup>, LC-Q-TOF, LC-Q-Trap.

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten System handelt es sich um eine HPLC-MS-QTrap-System und somit um ein Tandemmassenspektrometer mit linearen Ionenfalle und Kollisionszelle [103].

#### 2.4.3.1 Aufbau eines Tandemmassenspektrometers

Der Grundaufbau eines Tandemmassenspektrometers ist in Abbildung 2.4-7 dargestellt. Der Flüssigkeitsstrom der HPLC wird im Interface verdampft und die Analyten ionisiert. Das Interface, welches nur einen geringen Unterdruck besitzt, wird vom Hochvakuum des Massenspektrometers durch die zwei Lochblenden *curtain plate* und *orifice plate* getrennt. Zwischen den beiden Blenden wird Stickstoff als *curtain gas* geblasen um das MS z.B. vor Verunreinigungen zu schützen. Anschließend fokussieren die Ionenlinse (Skimmer) und der Q0 den Ionenstrom, damit dieser in einer stabilen Flugbahn den Q1 erreicht. Hinter dem Q1 befindet sich der Q2, welcher eine Kollisionszelle ist und die Molekülionen fragmentiert. Im Anschluss folgt der zweite Massenanalysator Q3, der bei

dem ABSciex QTrap 2000 eine lineare Ionenfalle ist. Nach dem Q3 folgt der Multiplier (Verstärker) und der Detektor.



**Abbildung 2.4-7 MS/MS:** Aufbau eines LC-Q-Trap System

#### 2.4.3.2 Elektrospray-Ionisation

Die Elektrospray-Ionisation (engl. *electrospray ionization*) ist eine weiche Ionisationsart, die für die Kopplung von HPLC-MS entwickelt wurde. Hierbei werden sowohl das Lösemittel verdampft als auch die Molekülonen ionisiert und in die Gasphase überführt.

Der aus der HPLC fließende Eluentenstrom gelangt über eine Metalkapillare in das Interface des MS. An der Spitze der Kapillare liegt eine Spannung an, die ein elektrisches Feld zwischen Kapillare und Gegenelektrode induziert. Bei einer positiven Spannung erfolgt eine Reduzierung der negativ geladenen Teilchen und es entsteht ein Überschuss an positiv geladenen Teilchen an der Spitze der Kapillare. Auf Grund der gleichen Ladung stoßen sich diese Moleküle voneinander ab und es entsteht ein kegelförmige Tropfen (Taylor-Kegel) in Richtung der Gegenelektrode, der zu einem Spray vernebelt wird. Das Spray bildet zwischen den beiden Elektroden ein Aerosol, welches aus kleinen Lösemitteltropfen und Molekülonen eines Ladungstypes (in diesem Fall positiv) besteht. Das entgegenströmende neutrale Gas (i.d.R. Stickstoff) führt zu einer weiteren Verdampfung des Lösemittels und zu einer Erhöhung der Ladungsdichte des schrumpfenden Tropfens. Ist der Tropfen so klein, dass die Ladungsdichte nicht mehr stabil ist (Rayleigh-Limit), explodiert der Tropfen in noch kleinere Tropfen (Coulomb-Explosion). Dieser Vorgang läuft solange, bis nur noch geladenen Teilchen in der Gasphase vorhanden sind (CRM-Modell, *charge residue model*) und diese in das Hochvakuum des MS gelangen [104].

#### 2.4.3.3 Quadrupol

Der Quadrupol ist der Massenfilter oder Analysator des Massenspektrometers, der die Molekülonen nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ ) auftrennt. Er besteht aus vier Metallstäben welche als Elektroden fungieren. Die beiden gegenüberliegenden Elektroden bilden ein Elektrodenpaar und

sind mit einer um 180 Grad phasenverschobener Hochfrequenz-Spannung verbunden. Zusätzlich liegt an den Elektroden eine Gleichspannung an. Gelangen Ionen in den Quadrupol bewegen diese sich in einer spiralförmigen Flugbahn durch ihn hindurch. Das Zusammenspiel aus Frequenz, Amplitude, Wechselfspannung und Gleichspannung ermöglichen nur Ionen mit einem bestimmten  $m/z$ -Verhältnis auf einer stabilen Flugbahn durch den Quadrupol zu fliegen. Andere Ionen fliegen gegen die Elektroden und werden eliminiert [105].

#### 2.4.3.4 Kollisionszelle

Bei der Tandemmassenspektrometrie wird zwischen den beiden Massenanalysatoren eine sogenannte Kollisionszelle angebracht, welche es ermöglicht, die Analyten zu fragmentieren und so z.B. ein spezifisches Massenspektrum zu generieren. Dabei treffen die Moleküle in der Kollisionszelle auf ein Inertgas (Argon oder Stickstoff) und werden energetisch so stark angeregt, dass sie auseinander brechen und Fragmente bilden.

#### 2.4.3.5 Ionenfalle

Die Ionenfalle (engl. *ion trap*) im ABSciex QTrap 2000 ist eine lineare Ionenfalle. Hierbei ist ein Quadrupol so modifiziert, dass am Ein- und Ausgang jeweils noch zwei Ringelektroden angebracht sind, die es ermöglichen ein geschlossenes Quadrupolfeld zu erzeugen und somit die Ionen in der Ionenfalle „einzusperren“ (trappen). Es gibt zwei denkbare Anwendungen für die Ionenfalle: Zum einen kann die Konzentration an Ionen erhöht werden und somit gebündelt zum Detektor geschickt werden, um eine höhere Empfindlichkeit zu bekommen. Zum anderen können spezifische  $m/z$  Molekülonen in der Ionenfalle getrapped werden, erneut fragmentiert und anschließend ausgelesen werden. Dies erhöht die Anzahl der Fragmentierungs-Experimente von  $MS^2$  auf  $MS^3$  [105].

#### 2.4.3.6 MS/MS

Bei der Verwendung von Tandemmassenspektrometern sind unterschiedliche Massenanalysatoren, z.B. Quadrupol und lineare Ionenfalle, miteinander gekoppelt. Durch die Kombination von unterschiedlichen Betriebsweisen der Massenanalysatoren können hier spezifische Methoden je nach Fragestellung entwickelt werden. Die beiden Grundbetriebsweisen der Quadrupole sind der Scan, in dem ein bestimmter  $m/z$ -Bereich untersucht wird und SIM (*single ion monitoring*), in dem eine oder mehrere  $m/z$ -Verhältnisse analysiert werden. Die wichtigsten Modi werden im folgendem kurz dargestellt.

### *Product Ion Scan*

Im Product Ion Scan wird Q1 im SIM-Mode betrieben und das auf  $m/z$ -Verhältnis eingestellt. Dieses gelangt anschließend in die Kollisionszelle und wird fragmentiert. Die einzelnen Fragmente werden im Q3, der im Scan-Modus betrieben wird, ausgelesen. Dieser Modus findet Anwendung, um aus bekannten Substanzen das Massenspektrum zu erzeugen.

### *Multi Reaction Monitoring*

Im *Multi Reaction Monitoring* (MRM) wird der Q1 im SIM betrieben und auf ein  $m/z$  –Verhältnis eingestellt. Die spezifischen Molekülionen gelangen dann in die Kollisionszelle, werden fragmentiert und gelangen in den Q3, welcher ebenfalls in SIM betrieben wird und somit nur spezifische Fragmente durchlässt. Der MRM-Modus ist der Standardmodus für die Routineanalyse, da er sich durch seine Spezifität gut zur Quantifizierung eignet.

### *Precursor Ion Scan*

Im *Precursor Ion Scan* (PIS) möchte man das „Mutterion“ (*precursor ion*) eines bestimmten Fragmentes ermitteln. Hierfür wird der Q1 im Scan betrieben und der Q3 im SIM. Sobald das vorgegebene Fragment-Ion aus der Kollisionszelle tritt, kann anhand der Scan-Einstellung des Q1 das Mutterion ermittelt werden.

### *Neutral Loss Scan*

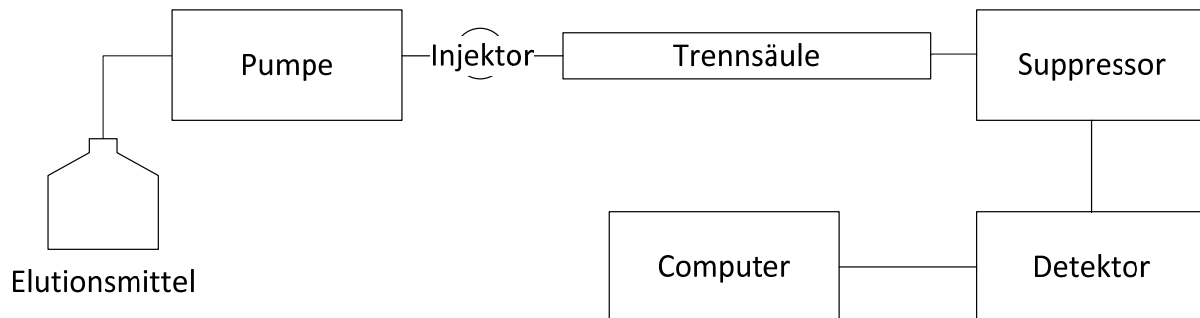
Beim Neutral Loss Scan werden sowohl Q1 als auch Q3 im Scan Modus betrieben. Gemessen werden sollen bestimmte Fragmentgruppen die neutral abgespalten werden wie z.B. Wasser (-18 Da). Über die Kombination der beiden Scans kann dann über die Differenzmessung ein Mutterion zugeordnet werden.

## 2.4.4 Ionen-Chromatographie

Die Ionen-Chromatographie (IC) zählt neben der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (engl. *high performance liquid chromatography* = HPLC) zu den chromatographischen Methoden zur Bestimmung von gelösten Analyten in wässrigen Medien. Bei der Ionen-Chromatographie unterscheidet man in hauptsächlich drei Trennmechanismen, die je nach eingesetzter Trennsäule zum Tragen kommt:

- Ionenpaar-Chromatographie
- Ionenaustausch-Chromatographie
- Innenausschluss-Chromatographie

Ionenaustausch-Chromatographie ist die am weitesten verbreitete IC-Methode. Hierbei werden typische Anionen wie Chlorid, Nitrit, Bromid, Nitrat, Sulfat oder Kationen wie Natrium, Kalium und Ammonium voneinander getrennt und analysiert. Da für die vorliegende Arbeit ausschließlich Ionenausschluss-Chromatographie betrieben wurde, wird nur dieser Trennmechanismus näher betrachtet. Desweiteren wird auf die beiden Besonderheiten der Ionen-Chromatographie, die chemische Suppression und die Leitfähigkeitsdetektion eingegangen. Der Grundaufbau der Ionen-Chromatographie ist in 2.4-8 als Blockfließbild dargestellt [106].



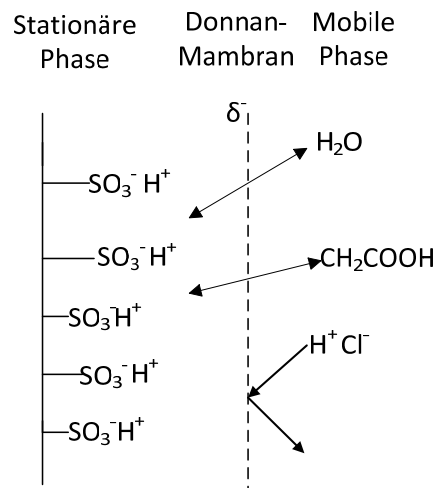
**Abbildung 2.4-8 IC-Fließbild:** Blockfließbild des Aufbaus eines IC Gerätes (in Anlehnung an [107]).

#### 2.4.4.1 Ionenausschluss-Chromatographie

Die Ionenausschluss-Chromatographie (engl. *size exclusion chromatography*) ist die klassische Vorgehensweise für die Auftrennung von organischen Säuren mit einem kleinen pKs-Wert. Das aktive Säulenmaterial besteht aus Sulfonsäuregruppen, welche durch Wassermoleküle teilweise hydratisiert sind. Der pH-Wert des Eluenten muss daher im sauren Bereich liegen (meist pH 2). Durch die Hydratisierung der Sulfonsäuregruppe entsteht, durch die im Wasser vorhandenen  $\text{OH}^-$ -Teilchen, eine partielle negativ geladene Membran (Donnan-Membran), welche nur für undissoziierte Moleküle passierbar ist. Starke anorganische Säuren wie Salzsäure können aufgrund der negativen Ladung diese Membran nicht durchdringen. Kleine Carbonsäuren wie Essigsäure oder Propionsäure liegen bei pH 2 vollständig protoniert vor und können somit durch die Donnan-Membran passieren und am Austauschharz adsorbieren. Der Trennmechanismus wird also durch Donnan-Ausschluss und Adsorption bestimmt. Der Adsorptionvorgang ist von der Polarität abhängig, unpolarere Carbonsäuren verbleiben somit länger auf dem Säulenmaterial [108]. Für die flüchtigen organischen Säuren ist somit folgenden Elutionsreihenfolge zu erwarten:

Essigsäure < Propionsäure < iso-Buttersäure < Buttersäure < iso-Valeriansäure < Valeriansäure.





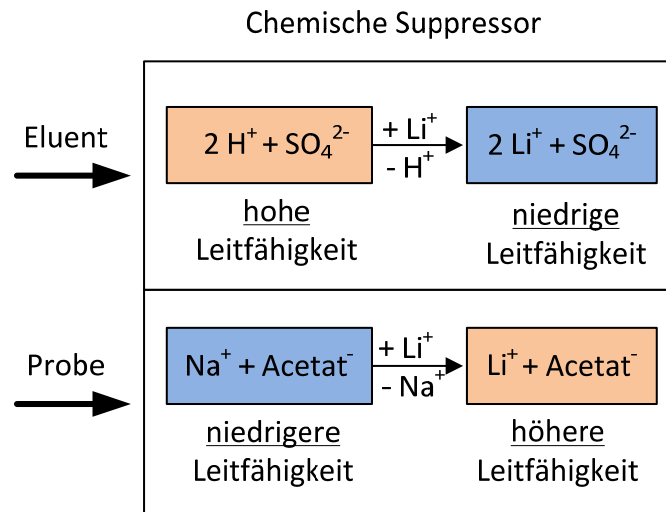
**Abbildung 2.4-9 IC Größen Ausschluss Chromatographie:** Schematische Darstellung der Ionen-Ausschluss-Chromatographie (in Anlehnung an [108])

#### 2.4.4.2 Leitfähigkeitsdetektor

Die Detektion der Leitfähigkeit von Ionen in wässriger Lösung ist hervorragend geeignet und gilt als das Standarddetektionsverfahren in der Ionen-Chromatographie. Hierbei wird in der Messzelle eine Elektrode eingebaut, an der eine sinusförmige Wechselspannung angelegt wird. Gemessen wird dann der Ohmsche Widerstand. Ionen, die durch die Messzelle an der Elektrode vorbei fließen, verringern den Widerstand an der Elektrode und erhöhen die Leitfähigkeit. Dies führt wiederum zum Ansteigen des Leitfähigkeitssignals und somit zum Messsignal [109].

#### 2.4.4.3 Chemische Suppression

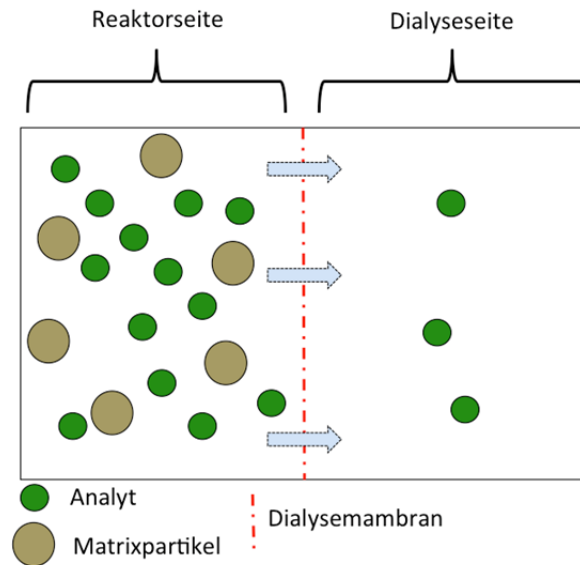
Die Empfindlichkeit und Robustheit des Detektors kann durch den Einsatz eines chemischen Suppressors erheblich gesteigert werden. Dieser senkt Grundleitfähigkeit des Eluenten und ermöglicht, dass die Analyten in sehr geringen Konzentrationsbereichen detektieren werden. Bei dem eingesetzten Suppressor der Firma Metrohm handelt es sich um einen kontinuierlich betreibbaren 3-Kammern-Suppressor. Die Kammern enthalten ein Ionenaustauscher-Harz, in dem bei der Suppression die freien Wasserstoffprotonen (hohe Leitfähigkeit) durch Lithium-Kationen (geringe Leitfähigkeit) ausgetauscht werden. Um einen kontinuierlichen Betrieb zu ermöglichen wird eine der Kammern zur Analyse verwendet, während die anderen beiden Kammern entweder regeneriert oder gespült werden. Nach jeder Injektion wird, wie in einem Revolver, umgeschaltet. Die frisch gespülte Kammer wird zur Analyse verwendet, die vorher verwendete Kammer wird mit LiCl-Lösung regeneriert und die dritte Kammer wird mit Reinstwasser gespült [110].



**Abbildung 2.4-10 IC Suppressor:** Vorgang der Reduktion der Hintergrundleitfähigkeit bei der Analyse von FOS mit chemische Suppression

#### 2.4.5 Dialyse

Im Bereich der Online- und Inline-Prozessanalytik gibt es diverse analytische Verfahren. Ein grundsätzliches Unterscheidungsmerkmal ist die Frage, ob das Verfahren eine Probenaufarbeitung benötigt oder nicht. Bei chromatographischen Methoden ist es in der Regel so, dass Proben partikelfrei vorliegen müssen. Ist dies prozessbedingt nicht der Fall, muss die Probe vor der Analyse aufgearbeitet werden. Hier haben sich vor allem Mikro- und Ultrafiltrationsverfahren etabliert. Diese neigen bei hohen Feststoffanteilen jedoch zu einer schnellen Verblockung der Membranen. Onlinedialyseverfahren könnten hier eine Lösung sein, da durch den fehlenden Sog an der Membran eine Verblockung nicht stattfinden sollte. Die Dialyse trennt sowohl Partikel von den Analyten, als auch Kolloide, Ölbestandteile, große Moleküle (10.000 Da) und Bakterien. Das grundsätzliche Prinzip der Onlinedialyse basiert auf dem Osmose-Verfahren. Hierbei werden zwei Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen durch eine semipermeable Membran voneinander getrennt [112, 113]. Durch diese semipermeable Membran können die Analyten auf Grund des osmotischen Druckes diffundieren. Für die vorliegende Arbeit wurde die Onlinedialysesonde der Firma Trace Analytics verwendet. Dabei werden Reinstwasser oder Puffer durch die Sonde geleitet. An der Grenzschicht der Dialysemembran in der Sonde findet die Analytendiffusion statt, bei der die Moleküle vom Reaktorinneren (Donatorlösung) zum Sondeninneren (Akzeptorlösung) wandern. Störende Matrixpartikel werden von der Membran zurückgehalten und unterliegen generell nicht dem Osmotischen Druck, da sie nicht gelöst sind. Die Probelösung wird im weiteren Verlauf zur Ionenchromatographie befördert und dort über das 6-Wege Ventil injiziert (TRACE Analytics; GmbH).



**Abbildung 2.4-11 Dialyse Vorgang:** Schematische Darstellung des Dialysevorganges. Hierbei wandern die Analyten (grün) durch die semipermeable Membran (rot) in die Akzeptorlösung

#### 2.4.5.1 Mathematische Grundlagen

Aufgrund des Konzentrationsunterschieds in Lösung A (z.B. Reaktor) und in Lösung B (z.B. Akzeptor-Lösung) findet ein spontan ablaufender Mischvorgang der beiden Lösungen statt und somit eine Diffusion der Analyten durch die Membran. Dabei gilt, dass wir in einem abgeschlossenen System eine Verringerung der **freien Enthalpie** ( $dG$ ) und eine Vergrößerung der **Entropie** erhalten. Die Entropie ist ein Maß für die Unordnung eines Systems und energetisch bevorzugt. Ein sich selbst überlassendes System strebt folglich immer eine Vergrößerung der Entropie an. Die Analyten in Lösung A haben durch das Diffundieren in Lösung B mehr mögliche Bewegungsfreiheitsgrade und führen somit das System einem energetisch günstigeren Zustand zu. Für das gesamte System gilt:

$$dG^{gesamt} = dG^{Lösung A} + dG^{Lösung B} \quad \text{Formel 2.4-5}$$

Der Zusammenhang von Konzentrationsänderung ( $n$  [mol]) und freier Enthalpie kann wie folgt beschrieben werden:

$$dG^{Lösung A} = \mu^{Lösung A} dn_{Analyt} \quad \text{und} \quad dG^{Lösung B} = \mu^{Lösung B} dn_{Analyt} \quad \text{Formel 2.4-6}$$

wobei  $\mu$  das chemische Potential [J] ist.

Da die Zunahme der Analyten in Lösung B (Akzeptor-Lösung) den Verlust der Analyten in Lösung A (Reaktorseite) ausgleicht gilt für die gesamte Änderung:

$$\mu^{\text{Lösung B}} \text{dn}_{\text{Analyt}} = -\mu^{\text{Lösung A}} \text{dn}_{\text{Analyt}} \quad \text{Formel 2.4-7}$$

und somit

$$\text{dG}_{\text{gesamt}} = (\mu^{\text{Lösung A}} - \mu^{\text{Lösung B}}) \text{dn}_{\text{Analyt}} \quad \text{Formel 2.4-8}$$

Solange das chemische Gleichgewicht ( $\text{dG} > 0$ ) noch nicht erreicht ist gilt:

$$\mu^{\text{Lösung A}} > \mu^{\text{Lösung B}} \quad \text{Formel 2.4-9}$$

Das System ist bestrebt diesen Zustand so zu ändern, dass die beiden chemischen Potentiale gleich sind. Solange eine Potentialdifferenz zwischen beiden Systemen besteht, findet eine Teilchenbewegung der Analyten in Richtung des niedrigeren Potentials statt [113, 115].

## 2.5 Validierung

Die Validierung dient der Sicherstellung, dass eine analytische Methode zuverlässige Messergebnisse liefert. Hierzu gibt es verschiedene Kriterien und Verfahren, die dieses nachweisen und dokumentieren. Die für chromatographische Verfahren relevanten Parameter sind im nachfolgenden Kapitel kurz erläutert.

### 2.5.1 Selektivität

Selektivität ist die Eigenschaft einer Methode, die unterschiedlichen zu untersuchenden Analyten nebeneinander bestimmen zu können. Hierbei dürfen sich zum einen die einzelnen Analyten nicht gegenseitig stören und zum anderen dürfen Matrixbestandteile keinen Störeinfluss auf die Analyse haben [115]. Bei chromatographischen Verfahren wird dies anhand der Auflösung (R) nachgewiesen. Dabei gilt ein Peakpaar als vollständig getrennt, wenn die Auflösung R gemäß Formel 2.5-1 einen Wert von größer/gleich 1,5 besitzt [115].

$$R = 1,18 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{0,5(1)} + w_{0,5(2)}} \quad \text{Formel 2.5-1}$$

$t_R$  = Retentionszeit

$w_{0,5}$  = Peakbreite in halber Höhe

### 2.5.2 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweisgrenze (engl. *limit of detection; LOD*) ist der kleinste Messwert, der mit der verwendeten Methode noch nachgewiesen werden kann (qualitativ). Die Bestimmungsgrenze (engl. *limit of quantification, LOQ*) hingegen ist der kleinste Messwert, der noch quantitativ bestimmt werden kann. Für die Nachweis- und Bestimmungsgrenze gibt es diverse Verfahren, um diese zu bestimmen. Neben der Kalibriergeradenmethode und der Leermethode (jeweils DIN 32645) findet in der Validierung vor allem die Berechnung des Signal-Rausch-Verhältnis (engl. *signal-to-noise, S/N*) Anwendung. Dabei gilt folgender mathematischer Zusammenhang:

$$NG = \bar{S}_{Bl} + 3 \cdot N_{\sigma} \quad \text{Formel 2.5-2}$$

$$BG = \bar{S}_{Bl} + 9 \cdot N_{\sigma} \quad \text{Formel 2.5-3}$$

$\bar{S}_{Bl}$  = Mittelwert des Signals des Blindwert-Rauschens zur Zeit des Analyten +/- 1 min

$N_{\sigma}$  = Standardabweichung des Signal des Blindwert-Rauschens zur Zeit des Analyten +/- 1 min

### 2.5.3 Linearität

Die Linearität einer Methode beschreibt den linearen Zusammenhang aus der Messgröße. Im Fall der IC ist es der Zusammenhang aus Leitfähigkeit und Konzentration des Analyten, im Fall der LC-MS/MS der Zusammenhang aus *counts per seconds* (cps) des Massenspektrometers und der Konzentration des Analyten [99, 100]. Dieser Zusammenhang gilt nur für einen bestimmten Konzentrationsbereich, welcher linearer Arbeitsbereich (engl. *linear working range*) genannt wird. Um diesen zu überprüfen, sollten mehrere Konzentrationen getestet werden. Gemäß ICH-Richtlinien für die Validierung von analytischen Verfahren sollten mindestens fünf Standardlösungen vermessen werden [100]. Das Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) der Regression gibt die Genauigkeit des linearen Zusammenhangs wieder. Das Bestimmtheitsmaß kann mathematisch zwischen 0 und 1 liegen, wobei 1 einer hohen Genauigkeit und 0 quasi keiner Genauigkeit entspricht. Für eine chromatographische Methode sollte dieses Maß bei  $\geq 0,999$  liegen [99].

### 2.5.4 Richtigkeit

Die Richtigkeit einer analytischen Methode beschreibt die Nähe des Messergebnisses zum „tatsächlichen“ oder „wahren“ Wert [99, 100]. Zur Bestimmung der Richtigkeit werden sechs Lösungen mit den verschiedenen Analyten unabhängig voneinander hergestellt und vermessen. Die Richtigkeit ermittelt sich aus folgendem mathematischen Zusammenhang:

$$R = \frac{\bar{x} \cdot 100}{\mu}$$

**Formel 2.5-4**

R= Richtigkeit

 $\bar{x}$ =Mittelwert $\mu$ =Sollwert

Um zu überprüfen, ob die Methode Analysenergebnisse liefert, welche innerhalb des Vertrauensbereiches (95 %) liegen, eignen sich Hypothesentests wie der Sollwert-t-Test. Hierzu wird der Wert-t wie folgt berechnet und mit Tabellenwerte abgeglichen.

$$t = \frac{|\bar{x} - \mu|}{\sigma} \sqrt{n}$$

**Formel 2.5-5** $\mu$ = Sollwert $\bar{x}$ =Mittelwert $\sigma$ =Standardabweichung

n= Anzahl der Messwerte

Dabei gilt, dass der Sollwert mit der vorgegebenen Wahrscheinlichkeit innerhalb des Vertrauensbereich (z.B. 95 %) liegt wenn  $t \leq t_{\text{Tabelle}}$  ist. Bei einer Wahrscheinlichkeit von 95 % und einer 6-fach-Bestimmung liegt  $t_{\text{Tabelle}}$  Wert bei 2,571.

### 2.5.5 Präzision

Die Präzision ist ein Maß für die Schwankung der Messwerte [99, 100]. Hierbei unterscheidet man die Systempräzision, welche durch die Schwankung des Messgerätes verursacht wird und der Methodenpräzision, durch die eine Ungenauigkeit des gesamten Prozesses (Messgerät, Pipette, etc.) verursacht wird. Die Systempräzision sollte bei unter 2 % liegen. Bezüglich der Methodenpräzision sollte die relative Standardabweichung weniger als 5 % betragen. Bei massenspektrometrischen Verfahren findet man hier auch höhere Werte, da prozentuale Fehler in der Spurenanalytik höher gewichtet sind.

### 2.5.6 Robustheit

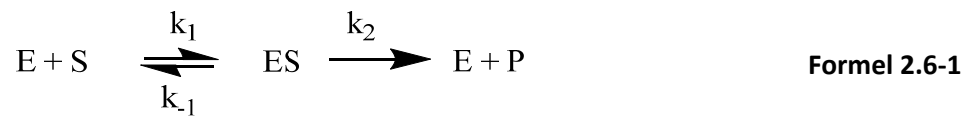
Die Robustheit einer Methode gibt eine Aussage, wie stark Schwankungen von Methodenparameter die Messergebnisse verfälschen [116, 117]. Eine robuste Methode liefert daher auch bei schwankenden Bedingungen gleiche Messwerte. Typische Bedingungen, welche Schwankungen unterliegen können sind Temperatur, pH-Wert des Eluents und Fließgeschwindigkeit.

## 2.6 Kinetische Auswertung

Der folgende Abschnitt befasst sich mit der kinetischen Beschreibung von enzymatischen Reaktionen. Dabei wird zuerst auf die klassische Michaelis-Menden Kinetik eingegangen und nachfolgend die daraus abgewandelte Auswertung für die Betrachtung der speziellen Fragestellung dieser Arbeit.

### 2.6.1 Michaelis-Menden Theorie

Die Umsetzung von Substraten (S) durch Enzyme (E) wird in der Regel anhand der Michaelis-Menden-Kinetik beschrieben. Dabei gilt, dass das Enzym mit dem Substrat einen Enzym-Substrat-Komplex (ES) bildet, aus dem anschließend das Produkt entsteht [117].



Für die einzelnen Reaktionen sind  $k_1$ ,  $k_{-1}$  und  $k_2$  die jeweiligen Geschwindigkeitskonstanten. Die Bildung des ES-Komplexes (Geschwindigkeitskonstante  $k_1$ ) läuft hierbei sehr schnell ab, wohingegen die Produktbildung ( $k_2$ ) sehr langsam abläuft. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Gesamtreaktion ist somit vom geschwindigkeitsbestimmenden Schritt ( $k_2$ ) abhängig. Als Kenngröße für enzymatische Reaktionen wird häufig die Michaeliskonstante ( $K_m$ ) bestimmt. Sie gibt die Substratkonzentration ( $c_{\text{Substrat}}$ ) an, bei der die Umsatzgeschwindigkeit halbmaximal ist. Sie ist mathematisch wie folgt definiert:

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad \text{Formel 2.6-2}$$

Der  $K_m$ -Wert ist Maß für die Affinität eines Enzyms zu dem Substrat. Hierbei gilt, je kleiner der  $K_m$ -Wert, desto höher die Affinität zum Substrat. Dem entsprechend hat eine Reaktion mit einem kleinen  $K_m$ -Wert bereits bei einer geringen Substratkonzentration eine hohe Umsetzung und folglich auch eine höhere Reaktionsgeschwindigkeit, sprich einen steileren Anstieg der Kurve im Anfangsverlauf. Abbildung 2.6-1 gibt die grafische Bestimmung des  $K_m$ -Wertes wieder.

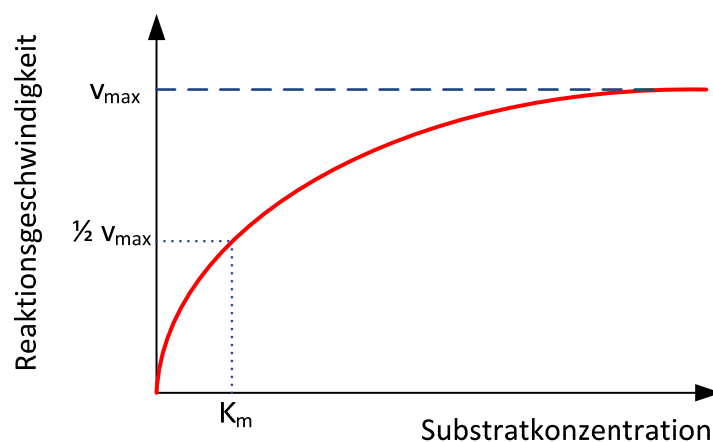


Abbildung 2.6-1 Michaelis-Menten-Diagramm: Graphischer Ermittlung der Michaelis-Menten-Konstante

Des Weiteren kann mittels  $K_m$ -Wert und  $v_{max}$  bestimmt werden, um welche Art der Enzymhemmung es sich handelt. Hierbei werden drei Hemmungstypen unterschieden:

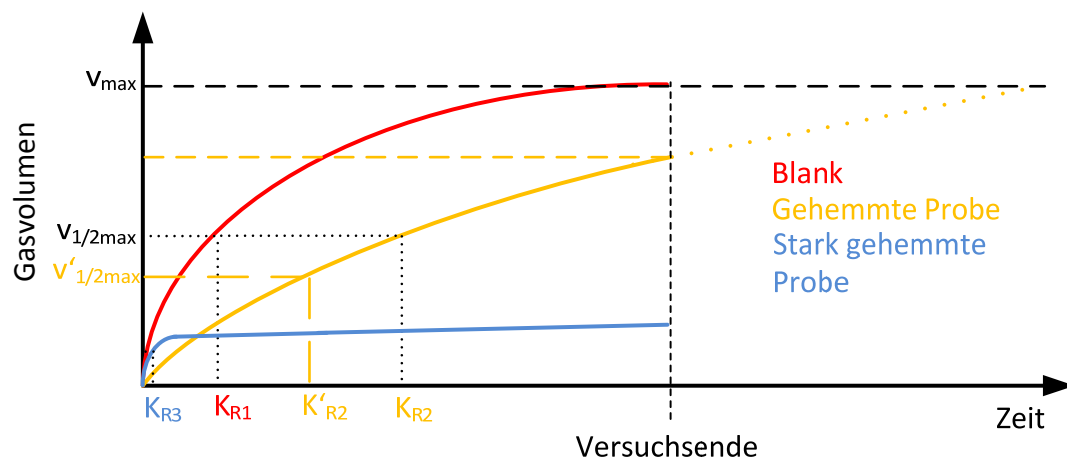
- a) Kompetitive Hemmung: Hierbei konkurrieren der Inhibitor und das Substrat um die Bindung am Enzym, die katalytische Aktivität des Enzyms wird herabgesetzt. Durch größere Zugabe an Substrat kann diese Hemmung behoben werden. Eine kompetitive Hemmung erhöht den  $K_m$ -Wert, lässt aber  $v_{max}$  unverändert [117].
- b) Nichtkompetitive Hemmung: Bei einer nichtkompetitiven Hemmung bindet der Inhibitor am Enzym und führt zu einer Konformationsänderung des Enzyms, welches somit inaktiviert wird. Dabei bleibt  $K_m$  unverändert und  $V_{max}$  wird reduziert [117].
- c) Unkompetitive Hemmung: Diese Hemmung tritt ein, wenn sich der Inhibitor spezifisch an den Enzym-Substrat Komplex bindet. Dabei wird sowohl  $v_{max}$  als auch der  $K_m$ -Wert gesenkt [117].

In der Regel sind Hemmungen reversibel. Dies ist im Fall der QACs nicht gegeben, da es sich hier um einen Zelltod (Lysis) handelt. Dementsprechend ist hier auch nicht von einer klassischen Hemmung, sondern von einer irreversiblen Inaktivierung der Zelle die Rede. Für die mathematische Bewertung und Vergleichbarkeit der Kurven untereinander wurden zwei Parameter betrachtet. Zum einen ist dies die prozentuale Endproduktion der Gasmenge ( $G_{\%}$ ) bezogen auf die ungehemmte Probe ( $V_{Blank}$ ), welche wie folgt definiert ist:

$$G_{\%} = \frac{V_{Probe} \cdot 100 \%}{V_{Blank}} \quad \text{Formel 2.6-3}$$

Des Weiteren wurde analog zur  $K_m$ -Wert Berechnung von Michaelis-Menden eine Konstante ( $K_{Relativ}$  bzw.  $K_R$ ) zur Beschreibung der Umsatzgeschwindigkeit definiert, welche die theoretische Reaktionszeit ( $T_R$ ) ermittelt, in der die Hälfte des Produktes, bezogen auf den jeweiligen Blank, hergestellt wurde. Hierbei wurde bei den gehemmten Proben die Kurve zum Endpunkt (Blank) interpoliert. Abbildung 2.6-2 verdeutlicht, warum diese Herangehensweise für die vorliegenden Untersuchungen sinnvoll ist. Betrachtet man den Kurvenverlauf des Blanks (rot) und einer normalen gehemmten Probe (gelb), zeigt sich, dass sowohl die standardmäßig ermittelte Konstante  $K'_{R2}$  als auch die Konstante mit dem interpolierten Endwert ( $K_{R2}$ ) jeweils größer sind als der Blankwert ( $K_{R1}$ ). In beiden Fällen wäre es somit eindeutig erwiesen, dass eine Hemmung vorliegt und eine Interpolation somit nicht nötig ist. Bei den vorliegenden Ergebnissen entsprechen die Kurvenverläufe hingegen eher der blau dargestellten Kurve. Bei der standardmäßigen Ermittlung des  $K_R$ -Wertes, in diesem Fall  $K_{R3}$ , ist der  $K_{R3}$  hingegen kleiner als der  $K_R$ -Wert des Blanks. Dies würde auf eine schnelle Reaktion hindeuten und eine Hemmung ausschließen. Die Interpolation der Kurve zum Endpunkt des Blanks hingegen führt zu einem deutlich erhöhten  $K_R$ -Wert.





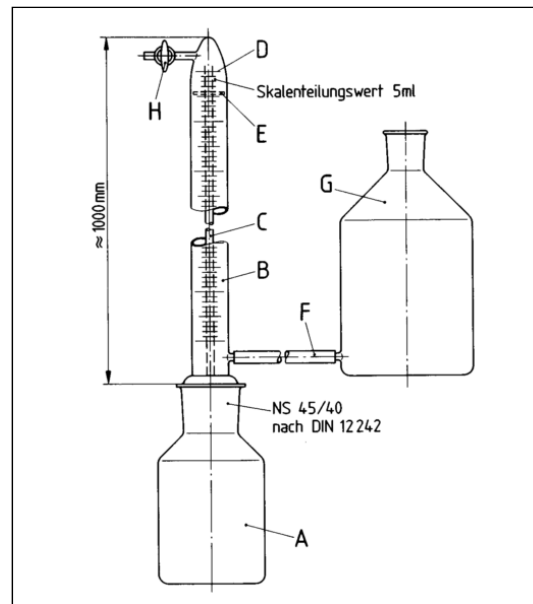
**Abbildung 2.6-2  $K_{\text{relativ}}$  Bestimmung:** Graphische Darstellung der Ermittlung von des  $K_R$ -Wertes am Beispiel des Blanks, einer gehemmten proben und einer stark gehemmten Probe.

### 3 Material und Methoden

Im nachfolgenden Kapitel werden zunächst die biologischen Testsysteme beschrieben sowie die analytischen Verfahren und Methoden beschrieben. Im Anschluss werden die einzelnen Versuche aufgeführt.

#### 3.1 Labor Biogasreaktor

Für die Bestimmung der biologischen Aktivität von anthropogenen Stoffen innerhalb des anaeroben Milieus wurden diskontinuierliche Batchreaktoren verwendet, welche es ermöglichen, die Bildung von Biogas zu bestimmen (Eudiometer). Hierzu wurden Gärtests in Anlehnung an DIN 38414 Teil 8 für diese Zwecke modifiziert, da die DIN Norm nur die Vergärung von Klärschlämmen, Filterrückständen und Abwässern behandelt und nicht das Vergären in Gegenwart eines anthropogenen Stoffes [118]. Für die Durchführung des Versuches wurde eine Eudiometer-Apparatur verwendet, wie sie im [118] aufgeführt ist. Die Standflasche wurde in einem Wasserbad bei 35°C temperiert und dauerhaft gerührt. Die komplette Apparatur wurde in einem dunklen Abzug gelagert. Die Apparatur (Abbildung 3.1-1) besteht aus einer 500 mL-Standflasche (A), welche als Vorlagegefäß dient. Über eine Schliffverbindung ist diese mit einem 400 mL-Eudiometerrohr (B) verbunden. Das Eudiometerrohr ist von unten nach oben graduert (2 mL Skalierungswert). Des Weiteren befindet sich ein Verbindungsrohr im Eudiometer, durch welches das sich entwickelnde Biogas von der Standflasche ins Messrohr überführt wird. Im Eudiometerrohr befindet sich eine Sperrflüssigkeit, die durch das aufsteigende Gas in die Vorlageflasche G verdrängt wird. Das verdrängte Gasvolumen verhält sich direkt proportional zum entstandenen Gasvolumen. Die Vorlageflasche G ist mit einem Gummischlauch mit dem Eudiometerrohr verbunden und wird so positioniert, dass das Eudiometerrohr vollständig gefüllt ist und in der Vorratsflasche noch ca. ein Viertel der Sperrflüssigkeit vorhanden ist. Zum korrekten Einstellen des Nullpunktes D wird der Kugelhahn H verwendet.



**Abbildung 3.1-1 Labor-Biogasreaktor:** Versuchsaufbau zur Bestimmung der anaeroben Hemmung; A 500 mL Standflasche für Schlammprobe; B 400 mL Eudiometerrohr; C Verbindungsrohr; D Nullmarke; E Haltestifte zwischen Mantel des Eudiometerrohres und Verbindungsrohr; F Schlauchverbindung; G 1 L Niveaugefäß; H Einweg-Kegelhahn; nicht abgebildet, Probeentnahmestelle mit Septum an Standflasche A, Wasserbad, Messfühler für Temperaturregelung, Magnetrührer [119]

### 3.1.1 Eudiometer Versuchsdurchführung

Für den Versuch wird 1 g mikrokristalline Cellulose (Sigma Aldrich, St. Louis/USA) eingewogen und in die Standflasche A überführt. Anschließend werden 150 mL des anaeroben Impfschlammes abgemessen und ebenfalls in die Standflasche A überführt. Für die Versuche mit anthropogenen Substanzen wird das entsprechende Volumen ebenfalls in die Standflasche A pipettiert. Um anaerobe Bedingungen zu schaffen wird die Standflasche für einige Zeit mit Stickstoff begast und dann mit einem Uhrglas verschlossen. Die Standflasche wird anschließend mit dem Eudiometerrohr gekoppelt und die Sperrflüssigkeit über den Kugelhahn eingestellt. Abschließend werden das Wasserbad und die Rührplatte unter die Standflasche angebracht und gestartet. Die Messwerte des entstandenen Gases werden messtäglich abgelesen und notiert. Jeder Versuch wird doppelt durchgeführt. Die Versuchsreihen bestehen aus je 2 · 2 Blanks, und 3 · 2 Versuchen mit unterschiedlichen Konzentrationen oder Stoffen. Die Versuchszeit beträgt in der Regel 30 Tage.

### 3.1.2 Herstellung der Sperrflüssigkeit

Die Sperrflüssigkeit sollte von ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften her eine geringe Lösbarkeit des entstehenden Gases aufweisen. Hierzu wurden 120 mL Schwefelsäure (98 %, Merck, Darmstadt/Deutschland) zu 4 L entionisiertem Wasser gegeben. In dieser Mischung wurden unter leichtem Erwärmen und Rühren 800 g Natriumsulfat-Decahydrat (>99 %, Carl Roth, Karlsruhe/Deutschland) gelöst. Anschließend wurde die Sperrflüssigkeit mit einigen Tropfen

Methylorange-Lösung (Merck, Darmstadt/Deutschland) rotorange gefärbt. Die Färbung dient der Vereinfachung des Ablesens der Skalierung.

### 3.1.3 Batch Versuchsreihen

Wie bereits einleitend erwähnt, wurden als anthropogene Stoffe zum einen das Pestizid Glyphosat und dessen Metabolit AMPA getestet als auch die fünf unterschiedlichen QACs. Hierbei wurde unterschieden in Screening- und Langzeitversuch. Die Screeningversuche wurden verwendet, um die richtigen Konzentrationsbereiche für die Langzeitversuche zu ermitteln. Diese waren deutlich kürzer als 30 Tage. Die Stoffe wurden sowohl einzeln als auch in Kombination getestet um mögliche Synergieeffekte zu ermitteln. Tabelle 3.1-1 gibt einen Überblick über alle durchgeführten Versuche.

### 3.1.4 Impfschlamm

Bei dem verwendeten Impfschlamm handelte es sich um anaerobe Biomasse aus dem Industrie-Fermenter der Firma Uniferm GmbH & Co. in Monheim. Der Schlamm wurde nach der Abfüllung für mind. vier Tage ohne Sauerstoffzufuhr in einem geschlossenen Kunststoffkanister gelagert. Eventuell entstandenes Biogas wurde durch regelmäßige Entlüftung abgelassen. Nach vier Tagen wurde in der Regel keine Gasproduktion mehr beobachtet, was auf einen Verbrauch von noch vorhandenem Substrat schließen lässt. Vor Verwendung wurde der pH-Wert überprüft.

**Tabelle 3.1-1 Eudiometer Versuche:** Auflistung aller durchgeführten Versuche zu Ermittlung der Hemmstoffkonzentration im anaeroben Bereich

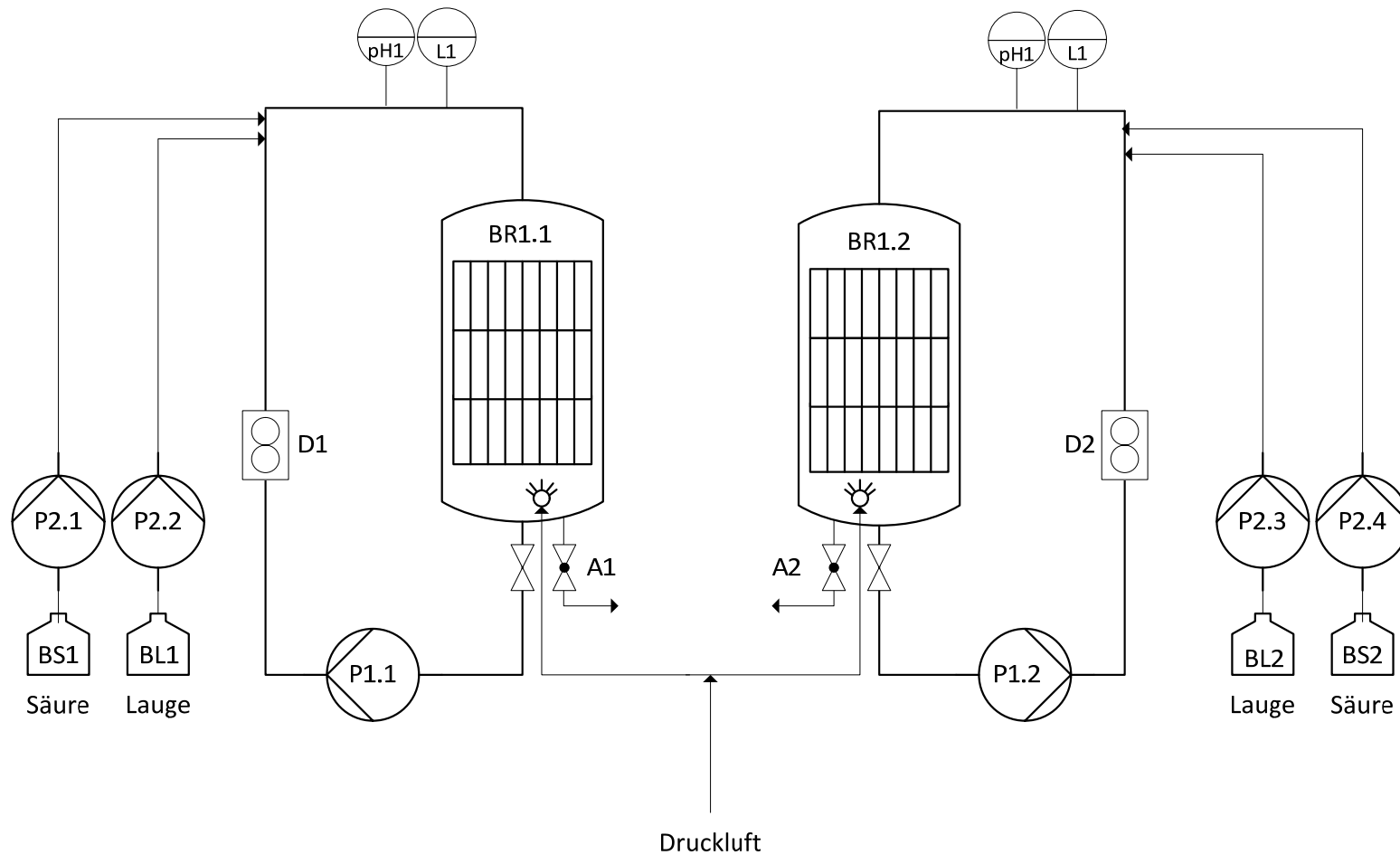
Versuchsreihe	Anthropogener Stoff	Konzentrationen [mmol·L <sup>-1</sup> ]	Versuchsdauer [Tage]	Bezeichnung
Versuch 1	Glyphosat	0,0015 / 0,014 / 0,15	30	Gly_1
Versuch 2	Glyphosat	1,5 / 15 / 50	30	Gly_2
Versuch 3	Glyphosat	20 / 30 / 40	30	Gly_3
Versuch 4	AMPA	20 / 40 / 60	30	AMPA_1
Versuch 5*	ATMA-C12	5 / 20 / 40	10	ATMA-C12_1
Versuch 6	BDMA-C16	0,1 / 0,25 / 0,5	10	BDMA-C16_1
Versuch 7	BDMA-C12	1 / 5 / 10	10	BDMA-C12_1
Versuch 8	ATMA-C16	1 / 5 / 10	8	ATMA-C16_1
Versuch 9	ATMA-C12	1 / 5 / 10	30	ATMA-C12_2
Versuch 10	ATMA-C16	1 / 5 / 10	30	ATMA-C16_2
Versuch 11	BDMA-C12	1 / 5 / 10	30	BDMA-C12_2
Versuch 12**	BDMA-C16	1 / 5 / 10	22	BDMA-C16_2
Versuch 13	BDMA-C16	1 / 5 / 10	30	BDMA-C16_3
Versuch 14	BDMA-C12-16 MIX	1 / 5 / 10	10	MIX1_1
Versuch 15	BDMA-C12-16 MIX	0,1 / 0,5 / 1	30	MIX1_2
Versuch 16	ATMA-C12-16 MIX	0,1 / 0,5 / 1	30	MIX2_1
Versuch 17	DDMA-C10	0,1 / 0,5 / 1	30	DDMA-C10_1
Versuch 18	DDMA-C10	1 / 5 / 10	30	DDMA-C10_2
Versuch 19	BDMA-C12-16-DDMA-C10	1 / 5 / 10	10	MIX3_1
Versuch 20	BDMA-C12-16-DDMA-C10	0,01 / 0,05 / 0,1	30	MIX3_2

\* $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 

\*\*Versuch 12 wurde abgebrochen wegen Undichtigkeiten

### 3.2 Aerobreaktor

Für die Bestimmung der biologischen Abbaubarkeit der QACs im aeroben Milieu wurde ein diskontinuierlicher Doppelbatchreaktor mit einem Fassungsvermögen von 30 L verwendet. Die Biomasse wurde hierbei im ersten Versuch auf einem Mikrobiofilmträgerwürfeln (Levapro®) immobilisiert, im zweiten Versuch ohne Mikrobiofilmträgerwürfel. Der Reaktorinhalt wurde in den Kreislauf gepumpt. Der pH Wert lag bei 6,5-7,5 und wurde mit 0,1 M NaOH (Merck, Darmstadt/Deutschland) bzw. 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (98 %, Merck, Darmstadt/Deutschland) eingestellt und geregelt. Als Anfangskonzentration wurde 0,05 mmol·L<sup>-1</sup> gewählt. Die Versuchsdauer betrug 2-4 Tage. Die verwendete Biomasse und das Abwasser wurden von der örtlichen Sickerwasserkläranlage genommen und vor Versuchsstart über mehrere Tage im Reaktor konditioniert. Während der Konditionierung wurde zusätzlich mit Druckluft begast, um aerobe Bedingungen einzustellen. Der Reaktor ist in Abbildung 3.2-1 schematisch dargestellt.



**Abbildung 3.2-1 Aerober Technikums -Biogasreaktor:** Doppelreaktor für den aeroben Abbau. BR1.1 und BR1.2 sind 30L Glasreaktoren mit Wandheizung und Festbett Immobilisierung. P1.1 und P1.2 sind Umwälzpumpen für den Reaktorinhalt. D1 und D2 sind Durchflussmessungen. P2.1, P2.2 P2.3 und P2.4 sind Dosierpumpen für Säure und Lauge. Im ByPass sind pH1, pH2, für die pH-Wertsmessung und L1 und L2 für die Leitfähigkeitsmessung. A1 und A2 sind Kugelhähne zur Entnahme der Probe

### 3.2.1 Adsorptionsversuch

Die Adsorption von ATMA-C12, ATMA-C16, BDMA-C12 und BDMA-C16 wurde an Schlammflocken und an Mikrobewuchskörpern getestet um zu bestimmen, wie stark die Eliminationsrate durch Adsorption beeinflusst wird. Hierzu wurde als erstes der Abdampfrückstand (ADR) des Belebtschlammes bestimmt, damit der Feststoffanteil in beiden Versuchen annähernd gleich gehalten wurde. Von allen QACs wurden einzelne Standards hergestellt.

400 mL des Belebtschlammes wurden in einem Becherglas mit Rührfisch auf eine Rührplatte gestellt und bei 300 rpm gerührt. Zu dem Belebtschlamm wurden 5 mL der hergestellten QACs Lösung pipettiert und für 5 Minuten gerührt. Nach 5 Minuten wurden 5 mL der Lösung entnommen und für die MS-Aufarbeitung verwendet. Die Zugabe und spätere Entnahme des gleichen Volumens verhindert, dass während der Aufarbeitung ein Volumenfehler auftritt. Dies wird insgesamt 12-mal wiederholt, was zu einer stetigen Erhöhung der QACs Konzentration in der Lösung führte.

Die zweite Versuchsreihe hierzu wird mit 400 mL Wasser und den Mikrobewuchskörpern durchgeführt. Der Abdampfrückstand des Belebtschlammes lag bei ca. 1 %. Dementsprechend wurden 40 g der Mikrobewuchskörper verwendet, was dem gleichen Feststoffgehalt entspricht wie im Belebtschlamm. Die anschließende Durchführung wurde wie bereits für den Belebtschlamm beschrieben durchgeführt.

Die Berechnung der Adsorptionsgrad wird wie folgt berechnet:

$$\text{Adsorptionsgrad} = \left( \frac{C_{\text{soll}}}{C_{\text{ist}}} \right) - 100 \quad \text{Formel 3.2-1}$$

$C_{\text{soll}}$  = theoretische Konzentration

$C_{\text{ist}}$  = gemessene Konzentration

### 3.3 Fettsäureanalyse

Für die Bestimmung der flüchtigen organischen Säuren (FOS) kommen unterschiedliche analytische Verfahren in Frage. Dabei gibt es sowohl kostengünstige Methoden wie die Titration, welche die Summe aller vorhandenen FOS in einer Probe ermittelt (Summenparameter) als auch chromatographische Methoden wie IC, HPLC und GC [110, 111], die es ermöglichen, substanzspezifische Informationen zu erhalten. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich die Bestimmung mittels IC und HPLC durchgeführt, da die Ermittlung und Beurteilung der Fettsäureprofile einen Kernpunkt dieser Arbeit darstellt.

### 3.3.1 Ionenchromatographie Methode

Für die Analyse der flüssigen Probe wurde das Ionenchromatographie System Metrohm 792 Basic (Metrohm, Herisau Schweiz) verwendet, welche mit einer Metrosep organic acid 250/7.8 IC-Säule ausgestattet war. Die Detektion erfolgte mittels Leitfähigkeitsdetektion mit vorgeschalteter chemischer Suppression. Als Laufmittel wird ein wässriger 5 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$  Eluent (Merck, Darmstadt/Deutschland) mit einer Fließgeschwindigkeit von  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  verwendet. Das Injektionsvolumen beträgt  $20 \mu\text{L}$ . Alternativ kann anstelle der Ionenchromatographie auch eine HPLC-Methode benutzt werden. Diese wird mit den gleichen Parametern wie die Ionenchromatographie durchgeführt. Abweichend hierzu ist nur die chromatographische Säule (Phenomenex ROA-organic acids /ebenfalls Ionen-Ausschluss-Prinzip) und die Detektion mittels UV-Absorption. Für alle Analysen sollte frisch hergestellte Kalibrierstandards für den Konzentrationsbereich  $0,01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  bis  $20,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  vermessen werden und Auswertung verwendet werden. Die Ermittlung der Konzentration erfolgt innerhalb des linearen Arbeitsbereiches mittels linearer Korrelation. Zur Übersicht sind die Geräteparameter in Tabelle 3.1-2 aufgeführt.

**Tabelle 3.1-2 IC-Parameter:** Instrumenten Einstellung und Gerätetypen für die Analyse der FOS mittels Ionenchromatographie

Parameter	Größe	Gerät	Name /Typ
Injektionsvolumen	$20 \mu\text{L}$	IC	Metrohm 792 Basic
Fließgeschwindigkeit	$1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$	Säule	Metrosep organic acid 250/7.8
Temperatur	Raumtemperatur		
Eluent	$5 \text{ mM} \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$		

#### 3.3.1.1 Chemikalien und Standards

Mixstandards für die FOS Kalibrierung wurden aus einzelnen Stocksolution hergestellt und in Reinstwasser angesetzt. Das Reinstwasser wurde mit der Nanopure Diamond (Leverkusen, Deutschland) frisch hergestellt und hatte einen Widerstand von unter  $18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ . Folgende flüchtigen organischen Säuren wurden verwendet: Essigsäure (>99 %, Merck, Darmstadt/Deutschland), Propionsäure (>99 % Merck, Darmstadt/Deutschland), Isobuttersäure (>98 % Merck, Darmstadt/Deutschland), Buttersäure (>99 % Merck, Darmstadt/Deutschland), Isovaleriansäure (>98 % Merck, Darmstadt/Deutschland), Valeriansäure (>98 % Merck, Darmstadt/Deutschland)



### 3.3.2 Aufarbeitung von realen Proben

Von der homogenen Probe werden 10 mL entnommen und für 15 Minuten bei 60.000 rpm zentrifugiert. Von dem Überstand wird 1 mL mittels Eppendorfpipette entnommen und 1 zu 9 mit Reinstwasser in einem Messkolben verdünnt. Die verdünnte Probe wird anschließend über einen Spritzenaufsatzfilter (Chromafil® A-20/25, 0,2  $\mu\text{m}$ , Cellulose Mischester, Macherey-Nagel, Düren/Deutschland) filtriert und kann so mittels Ionenchromatographie analysiert werden.

### 3.3.3 Validierung der Ionenchromatographie

Wie in Kapitel 2.5 beschrieben gibt es unterschiedliche Parameter, die getestet werden müssen, um zu garantieren, dass eine Methode valide Messergebnisse liefert. In den nachfolgenden Unterkapiteln wird die Durchführung dieser Validierung beschrieben.

#### 3.3.3.1 Selektivität

Zur Untersuchung der Selektivität wurden zwei verschiedene Modelllösungen hergestellt. Als erstes wurden die Analyten in Reinstwasser angesetzt ( $0,1 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ ), um eine Beeinflussung der einzelnen Analyten untereinander auszuschließen. Des Weiteren wurde eine frische anaerobe Schlammprobe als Realmatrix verwendet, ebenfalls mit den Analyten ( $0,1 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ ) versetzt. Zusätzlich wurden mögliche Störkomponenten wie Laktat, Methanol und Ameisensäure zugesetzt (engl. *gespiked*), um Aktivitätsveränderungen und Matrixeffekte zu erfassen. Als Parameter wurde neben der Retentionszeit vor allem die Auflösung (R) herangezogen, welche gemäß der in Kapitel 2.5.1 dargestellten Formel ermittelt wurde.

#### 3.3.3.2 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Bestimmung des LOD und LOQ wurde mittels Signal-Rausch-Verhältnis ermittelt. Hierfür wurde ein Blank (mit Matrix) vermessen. Aus dem Chromatogramm wurden zu den entsprechenden Retentionszeiten der einzelnen Analyten,  $\pm 1$  Minute, jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung des Rauschens ermittelt. Der LOD und der LOQ wurden gemäß der Formel 2.5-2 und 2.5-3 berechnet.

#### 3.3.3.3 Linearität

Für die Bestimmung der Linearität wurden sechs Standardlösungen im Konzentrationsbereich von  $0,01$  bis  $5 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$  hergestellt und vermessen. Die entsprechenden  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  und  $\text{mMol} \cdot \text{L}^{-1}$  sind für die einzelnen Säuren bei den Ergebnissen in Tabelle 4.1-3 aufgeführt. Jeder Standard wurde als Mix-Standard hergestellt, in dem jede einzelne Säure vorhanden war. Die Lösungen wurden im Messkolben angesetzt und die Reinsubstanzen mittels einer Eppendorf-Pipette überführt und anschließend die Lösung homogenisiert und vermessen.

#### 3.3.3.4 Richtigkeit

Zur Bestimmung der Richtigkeit wurden sechs Lösungen mit den verschiedenen flüchtigen organischen Säuren unabhängig voneinander hergestellt und vermessen. Für die einzelnen Analyten betrug die Konzentration  $0,66 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ . Anschließend wurde die prozentuale Abweichung zum Sollwert gemäß Formel 2.5-4 berechnet. Darüber hinaus wurde der Vertrauensbereich von 95 % mit einer Sollwert-T-Test Analyse überprüft.

#### 3.3.3.5 Präzision

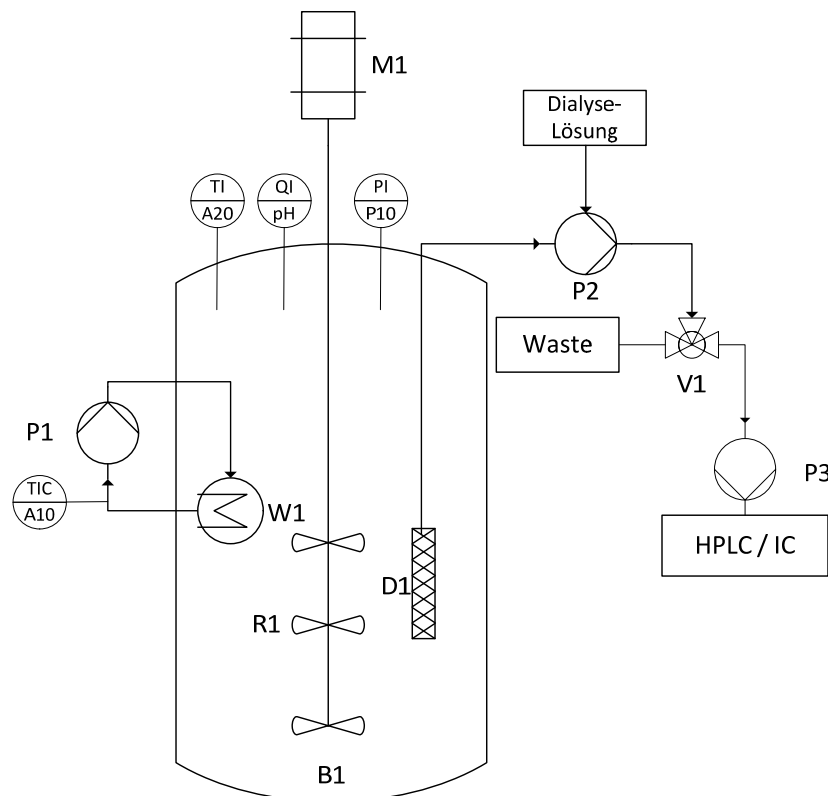
Für die Systempräzision wurde eine Probe mit den verschiedenen flüchtigen organischen Säuren im Konzentrationsbereich von  $0,66 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$  hergestellt und sechs Mal hintereinander injiziert. Aus den einzelnen Injektionen wurde die relative Standardabweichung der Peakflächen bestimmt. Für die Methodenpräzision wurden sechs Lösungen, analog zu der oben genannten Probe unabhängig voneinander hergestellt, vermessen und analog zur Systempräzision ausgewertet.

#### 3.3.3.6 Robustheit

Für die Robustheit gibt es diverse Parameter, die man variiert werden können. Für die vorliegende Methode wurde die Flussrate geändert. Hierzu wurde ein Standardmix vermessen bei den Flussraten von  $0,4 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $0,6 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$  und  $0,8 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ . Anschließend wurde wie bereits bei der Selektivität beschrieben, die Auflösung gemäß Formel 2.5-1 ermittelt.

### 3.4 Onlinedialyse

Neben der offline Analyse des Fettsäureprofils, sollte getestet werden, ob sich die Onlinedialyse als Probenvorbereitung und Kopplungstechnik für die Ionenchromatographie eignet. Hierfür wurde die Online Dialysesonde der Firma TRACE (TRACE Analytics GmbH, Braunschweig/Deutschland) getestet. Die Dialysemembran wurde aufgrund der fehlenden Hydrolyseresistenz mit einer Polyethersulfonsäure-Membran (Satorius AG, Göttingen, Deutschland) geschützt. Als Akzeptorlösung der Dialyse wurde Reinstwasser verwendet, welche über eine Schlauchpumpe mit einer konstanten Fließgeschwindigkeit von  $0,2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  gefördert wurde. Die beladene Dialyselösung wurde über einen selbstgebauten 3-Wegeadapter zu einer HPLC-Pumpe (Knauer, Berlin/Deutschland) gepumpt. Anschließend wurde der Dialysestrom zur Ionenchromatographie (Metrohm 792 Basic, Metrohm Herisau, Schweiz) gefördert und das Fettsäureprofil ermittelt. Die Online Kalibrierung wurde im Konzentrationsbereichen von  $0,2$  bis  $3 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$  durchgeführt. Für die Online Messreihe wurde ein selbstgebautes 8 L Batchreaktorsystem verwendet, welcher in Abbildung 3.4-1 dargestellt ist. Als Impfschlamm fungierte der anaerobe Schlamm der Firma Uniform (Uniform, Monheim/Deutschland).



**Abbildung 3.4-1 Anaerober Biogasreaktor mit Onlinedialyse-IC:** B1 8L Glasreaktor, D1, Dialysesonde, M1 Motor, P1 Pumpe für den Heizspiralen, P2 Schlauchpumpe für die Dialyselösung, P3 HPLC-Kolbenpumpe für die Beförderung der Probe. R1 Schaufelrührwerk. V1 Dreiwegestück. W1 Heizspiralen TI/A10 Wasserbadtemperatur, TI/A20 Reaktortemperatur, OI/pH pH-Wert, PI/P10 Reaktordruck.

### 3.5 Massenspektrometrie

Die Ergebnisse der Validierung und Methodenentwicklung der LC-MS/MS-Methode und die daraus resultierenden Methodenparameter sind ausführlich in Kapitel 4.2 beschrieben. Die folgenden Abschnitte sollen daher nur eine Übersicht über die eingesetzten Geräte und Chemikalien, sowie über die Probenaufarbeitung geben.

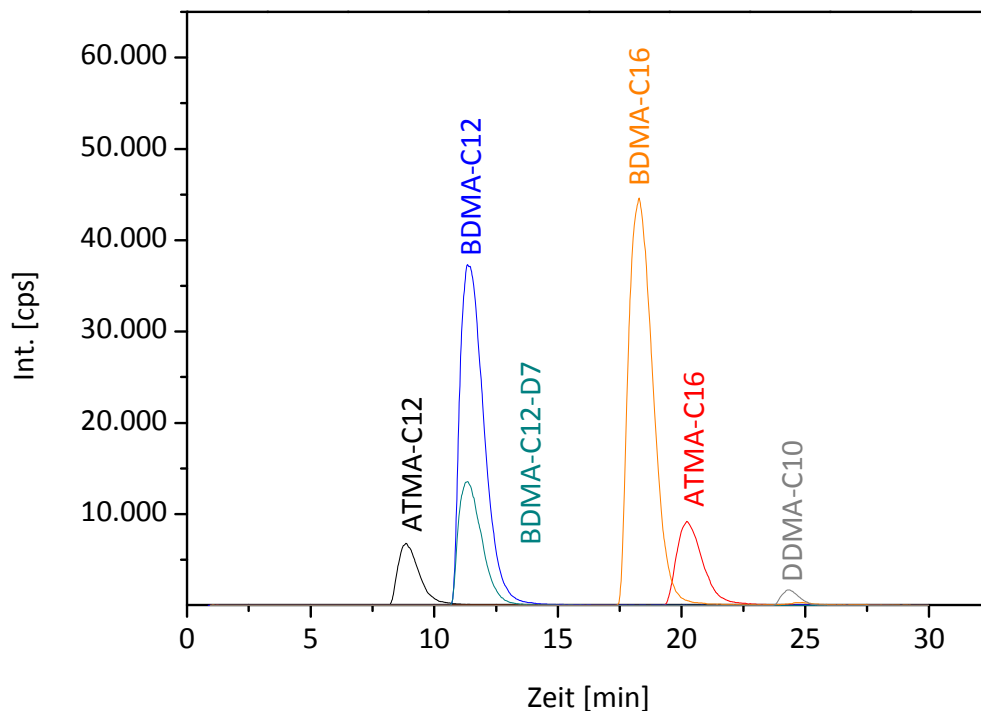
#### 3.5.1 HPLC-MS/MS Methode

Für eine simultane Analyse von den Monoalkylaminen (ATMA-C12/ATMA-C16), den Benzylalkylaminen (BDMA-C12 und BDMA-C16) sowie dem Dialkylamin (DDMA-C10) wurde eine HPLC-MS/MS Methode entwickelt. Das verwendete HPLC-MS/MS System bestand aus einem Agilent HPLC-1100 gekoppelt an einem ABSciex 2000QTrap Massenspektrometer. Der verwendete Stickstoff wurde über einen Stickstoffgenerator (CMC, Eschborn/Deutschland) hergestellt. Für die chromatographische Trennung wurde eine Prontosil –C18 Säule (Bischoff, Leonberg/Deutschland) verwendet. Als Eluenten wurde Wasser mit 0,1 % Ameisensäure (Merck, Darmstadt/Deutschland) (Eluent A) und Methanol (Merck, Darmstadt/Deutschland) mit 0,1 % Ameisensäure (Eluent B) verwendet. Die Geräteparameter sind in Tabelle 3.5-1 aufgeführt. Ein exemplarisches Chromatogramm ist in Abbildung 3.5-1 dargestellt.

**Tabelle 3.5-1 HPLC-Methode:** Einzel Parameter der HPLC Methode für die chromatographische Trennung von ATMA-C12; ATMA-C16; BDMA-C12; BDMA-C16; DDMA-C10 und des ITSD BDMA-C12-D7

Parameter		Zeit [min]	Eluent A [%]
Säule	Prontosil –C18 Säule	0	40
Säulendimension	120 x 4 mm	10	30
Partikelgröße	3 µm	18	30
Flussrate	0,5 mL·min <sup>-1</sup>	20	10
Temperatur	60°C	22	10
Injektionsvolumen	5 µL	28	40
Eluent A	Wasser mit 0,1 % Ameisensäure	30	40
Eluent B	Methanol mit 0,1 % Ameisensäure		

Gradienten-Programm



**Abbildung 3.5-1 LC-MS/MS Chromatogramm:** HPLC-MS/MS Chromatogramm von Dodecyltrimethylammonium (ATMA-C12), Benzyl-dodecyl-dimethylammonium (BDMA-C12), interner Standard D7-Benzyl-dodecyl-dimethylammonium (BDMA-C12-D7), Benzylhexadecyl-dimethylammonium (BDMA-C16), Hexadecyltrimethylammonium (ATMA-C16), Didecyl-dimethylammonium (DDMA-C10)

#### 3.5.1.1 Chemikalien und Standards

Standards wurden mit Reinstwasser hergestellt. Jede Probe wurde im Ultraschallbad ohne Temperatureinwirkung, bis zum vollständigen Lösen behandelt. Als QACs wurden folgenden Substanzen verwendet: Dodecyltrimethylammonium Chlorid (Alfa Aesar, Haverhill, USA), Hexadecyltrimethylammonium Chlorid (Acros Organics Thermofischer, Geel Belgien), Benzyl-dodecyl-dimethylammonium Chlorid (Merck, Darmstadt/Deutschland), Benzylhexadecyl-dimethylammonium Chlorid (Sigma Aldrich, St. Louis/USA), 80 % a.q. Didecyl-dimethylammonium Bromid (Alfa Aesar, Haverhill, USA). Die Standards wurden bei Raumtemperatur lichtgeschützt gelagert. Vor der Verwendung wurden die Standards erneut im Ultraschallbad behandelt und homogenisiert.

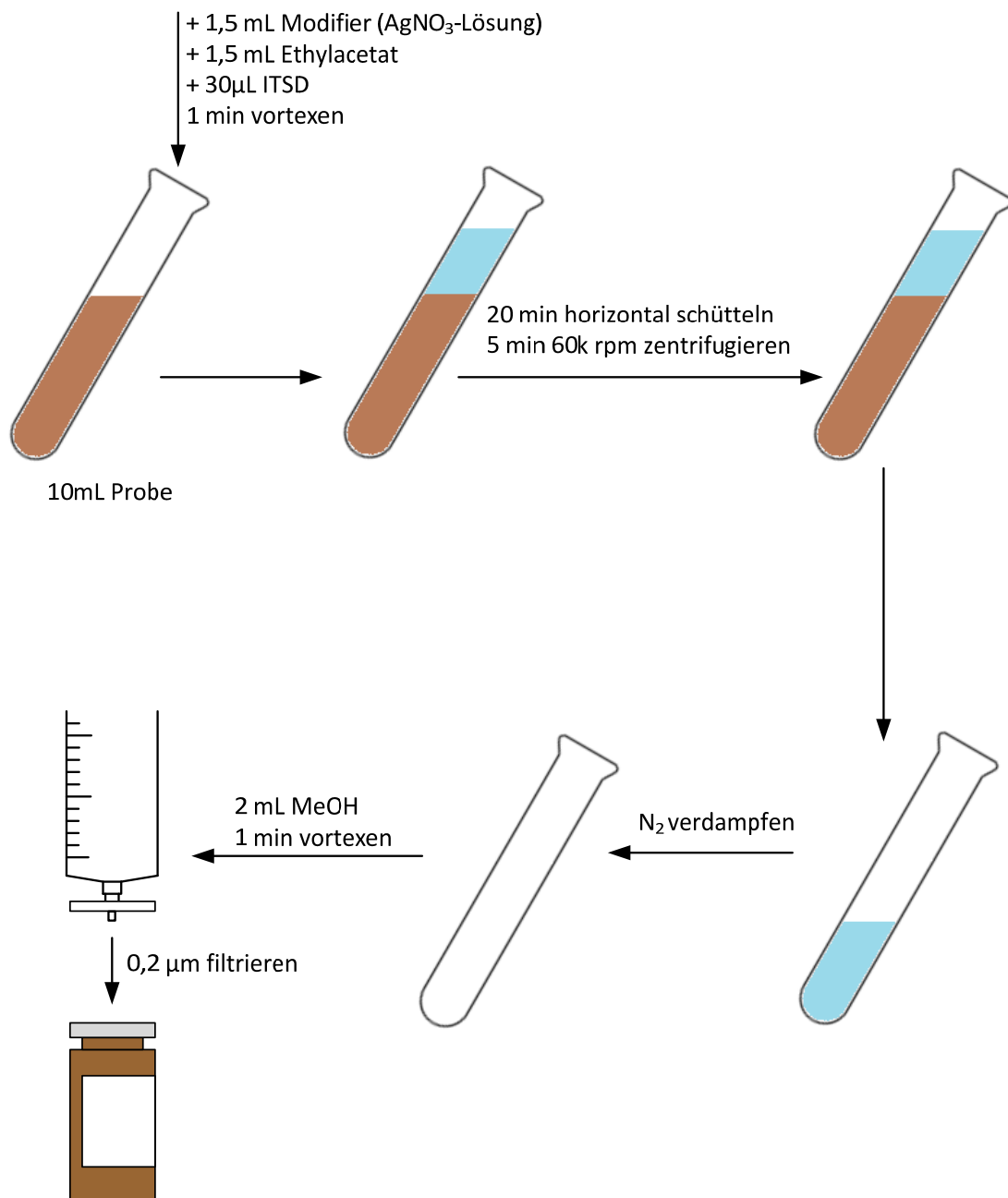
#### 3.5.2 Probenaufarbeitung für wässrige Proben

Aus dem Reaktorauslass werden ca. 400 mL Probe entnommen, um eine möglichst repräsentative Probe zu erhalten. Von diesen 400 mL Probe, werden 20 mL in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Der Rest der Probe wird wieder zurück in den Reaktor zurückgeführt. Die Probe wird für 5 Minuten bei 45.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wird 1 mL des Überstands entnommen und mit 30 µL des internen Standard (Konzentration  $0,2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) versetzt und homogenisiert. Im Anschluss wird die Probe

über einen Spritzenaufsatzfilter (Chromafil® A-20/25, 0,2 µm, Cellulose Mischester, Macherey-Nagel, Düren/Deutschland) filtriert und in ein HPLC Vial überführt.

### 3.5.3 Probenaufarbeitung für feste oder flüssig/feste Proben

Der übersichtshalber wird die Aufarbeitung von Proben mit einem höheren Feststoffanteil in Abbildung 3.1-2 schematisch dargestellt. Die Modifier-Lösung bestand aus 60 % AgNO<sub>3</sub>-Lösung und 40 % Methanol. Die Aufarbeitung ist in Anlehnung an der bereits in der Literatur beschriebene Aufarbeitung von Martinez-Carballo [58, 61].



**Abbildung 3.5-2 LC-MS/MS Probenaufarbeitung:** Schematische Darstellung der Probenaufarbeitung für Proben mit einem hohen Feststoffanteil für die Analyse mittels HPLC-MS/MS

### 3.5.4 Validierung der HPLC-MS/MS

Wie in Kapitel 2.5 beschrieben, gibt es unterschiedliche Parameter die getestet werden müssen, um zu garantieren, dass eine Methode valide Messergebnisse liefert. In den nachfolgenden Unterkapiteln wird die Durchführung dieser Validierung beschrieben.

#### 3.5.4.1 Selektivität

Zur Untersuchung der Selektivität wurden eine Modelllösungen hergestellt, welche alle Analyten in unterschiedliche Konzentrationen enthielt, um die Beeinflussung der einzelnen Analyten untereinander auszuschließen. Diese Lösung wurde im MRM-Modus vermessen und jede einzelne Ionenspur-Chromatogramm (engl. *extracted ion chromatogram*) ausgewertet. Abweichend zur Validierung der IC, muss die Auflösung zweier Peakpaare im MRM-Modus nicht zwingend größer 1,5 sein, da die Peaks als einzelne Ionenspur vorliegen und somit auch bei einer geringeren theoretischen Auflösung selektiv a

usgewertet werden können. Nichtsdestotrotz sollte, um Ionensuppressions-Effekte auszuschließen, auch beim MRM-Modus eine Auflösung von  $R \geq 1,5$  vorliegen.

#### 3.5.4.2 Nachweis und Bestimmungsgrenzen

Die Bestimmung des LOD und LOQ wurde für die LC-MS/MS Methode ebenfalls mittels Signal-Rausch-Verhältnisses ermittelt. Hierfür wurde ein Blank vermessen und aus den einzelnen Ionenspuren bei den jeweiligen Retentionszeiten, 1 Minute, der Mittelwert und die Standardabweichung des Rauschens ermittelt. Der LOD und der LOQ wurden gemäß Formel 2.5-2 und 2.5-3 berechnet.

#### 3.5.4.3 Linearität

Es wurde sowohl die Linearität als auch der Linearerarbeitsbereich der Methode ermittelt. Hierfür wurden Standardlösungen im Konzentrationsbereich von  $0,01 \mu\text{Mol}\cdot\text{L}^{-1}$  bis  $10 \text{ mMol}\cdot\text{L}^{-1}$  hergestellt und vermessen. Jeder Standard wurde als Einzelstandard ohne Matrix in Reinstwasser hergestellt. Hierfür wurden die Lösungen im Messkolben angesetzt und die Reinsubstanzen mittels einer Eppendorf-Pipette überführt und anschließend die Lösung homogenisiert. Wie unter 4.2.4 gezeigt, hat die Matrix bei der Verwendung der MRM-Methode keinen Einfluss auf das Messsignal. Eine Kalibrierung mittels matrixfreien Standard (externe Kalibrierung) ist somit zulässig, da keine Verschiebung der Linearität zu erwarten ist.

#### 3.5.4.4 Wiederfindung und Richtigkeit

Die Wiederfindung und Richtigkeit wurde für die Aufarbeitung der flüssigen Proben durchgeführt, da nur die flüssigen Proben für eine quantitative Analyse des Abbaus der QACs verwendet wurden. Hierzu wurde eine Referenzlösung und sechs Probelösung mit der gleichen Konzentration von

0,05 mMol·L<sup>-1</sup> unabhängig voneinander hergestellt. Von der Referenzlösung wurden 0,5 mL der Lösung und 15 µL des internen Standards in ein Vial überführt und homogenisiert. Die Probe wurde sechsmal vermessen und der Mittelwert der gemessenen Flächen als 100 % gewertet. Von den Probelösungen wurden 0,5 mL mit 15 µL des internen Standards versetzt und über einen Spritzenvorsatzfilter in ein Vial überführt. Alle Lösungen wurden zweimal vermessen. Nach jeder Messung der Referenz und Probelösungen wurde ein Blank vermessen.

Folgendes Berechnungsschema wurde für die Korrektur mit internen Standards verwendet.

$$\text{Richtigkeit} = \left( \frac{Re_{ITSD}}{Re_{ITSD-Probe}} \right) * Re_{QAC Probe}$$

**Formel 3.1-1**



## 4 Ergebnisse und Diskussion

Die nachfolgenden Kapitel sind unterteilt in die Ergebnisse der analytischen Entwicklungen und Validierungen. Dabei wird als erstes (Kapitel 4.1) die Validierung der Methode zur Bestimmung von flüchtigen organischen Säuren mittels Ionenchromatographie beschrieben. Im Anschluss (Kapitel 4.2) ist die Methodenentwicklung und Validierung der HPLC-MS/MS zur Bestimmung von QACs beschrieben und die entwickelte Onlinedialyse (Kapitel 4.3). Abgeschlossen wird das Kapitel mit den erzielten Ergebnissen zum Einfluss der getesteten anthropogenen Stoffe auf die Biogasrate. Dabei werden zuerst die Ergebnisse der Testung mit Glyphosat und AMPA (Kapitel 4.4) beschrieben und diskutiert und im Anschluss die Ergebnisse der QACs (Kapitel 4.5).

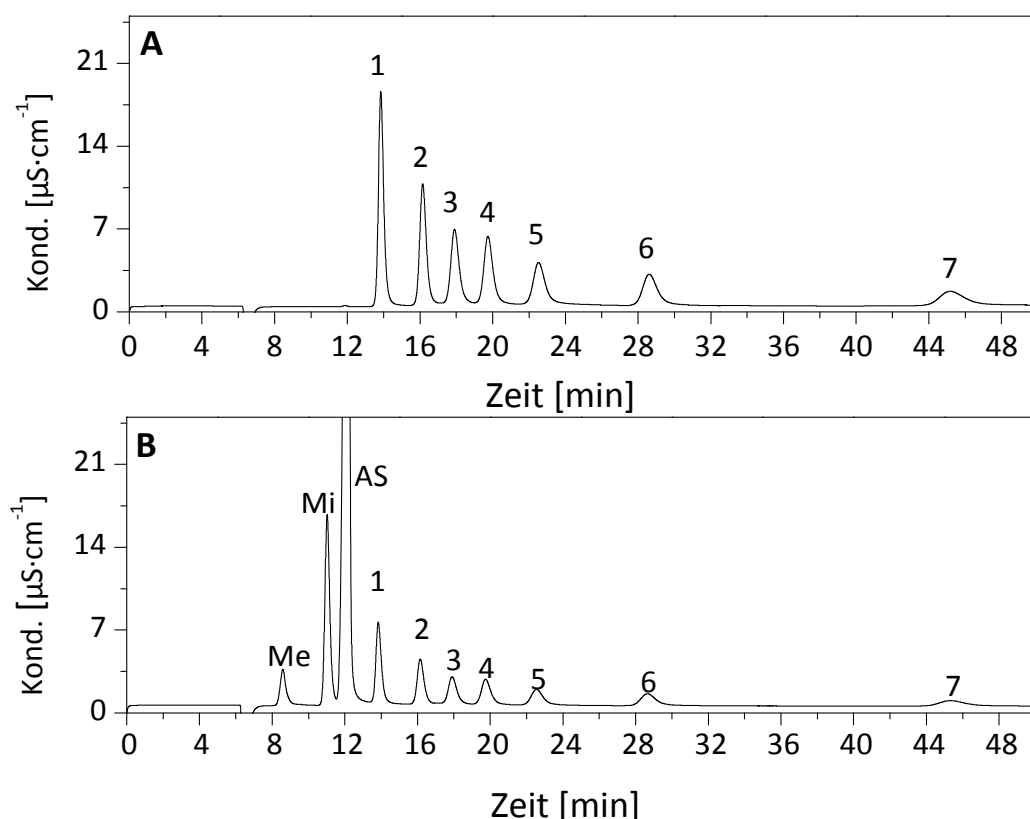
### 4.1 Validierung der Ionenchromatographie

Es werden die Ergebnisse der Validierung der entwickelten Methode zur Bestimmung von Fettsäuren aus anaeroben Schlammproben mittels Ionenchromatographie gemäß der theoretischen Grundlagen aus Kapitel 2.5 (S. 47) dokumentiert.

#### 4.1.1 Selektivität

Zur Untersuchung der Selektivität wurden zwei verschiedene Modelllösungen hergestellt. Als erstes wurden die Analyten in Reinstwasser angesetzt ( $0,1 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ ) um eine Beeinflussung der einzelnen Analyten untereinander auszuschließen. Des Weiteren wurde eine frische anaerobe Schlammprobe als Realmatrix verwendet, ebenfalls mit den Analyten ( $0,1 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ ) versetzt. Zusätzlich wurden mögliche Störkomponenten wie Laktat, Methanol und Ameisensäure zugesetzt, um mögliche Aktivitätsveränderungen und Matrixeffekte zu erfassen. Als Parameter wurde neben der Retentionszeit vor allem die Auflösung (R) herangezogen. Dabei gilt ein Peakpaar als vollständig getrennt, wenn  $R \geq 1,5$  ist [115].

Abbildung 4.1-1 zeigt die Chromatogramme der untersuchten Modelllösungen. Die Vermessung der Reinstwasser-Modelllösung (Abbildung 4.1-1, Chromatogramm A) lässt erkennen, dass die einzelnen organischen Fettsäuren sich nicht untereinander stören. Die Vermessung der gespikten Realmatrix (Abbildung 4.1-1, Chromatogramm B) zeigt, dass die Matrix und die Störkomponenten ebenfalls keinen Einfluss auf die Hauptkomponenten haben. Die Methode ist somit auch in Realmatrixproben robust genug für die selektive Bestimmung der einzelnen flüchtigen organischen Säuren. Die Retentionszeiten und die Auflösungen sind in Tabelle 4.1-1 aufgeführt.



**Abbildung 4.1-1 IC Selektivität:** Chromatogramm A/B mit Essigsäure (1) Propionsäure (2) Isobuttersäure (3) Buttersäure (4) Isovaleriansäure (5) Valeriansäure (6) Capronsäure (7). Chromatogramm A FOS in Reinstwasser, Chromatogramm B FOS in Realmatrix gespiked mit Methanol (Me), Milchsäure (Mi) und Ameisensäure (AS)

**Tabelle 4.1-1 Selektivität:** Retentionszeiten (RT) und Auflösung ( $R_s$ ) für die flüchtigen organischen Säuren ermittelt aus Chromatogramm A.

Peak #	Substanz	Retentionszeit T [min]	Auflösung $R_s$
Me	Methanol	8,73	-
Mi	Milchsäure	11,07	5,81
AS	Ameisensäure	12,07	2,48
1	Essigsäure	13,84	4,18
2	Propionsäure	16,15	4,36
3	Isobuttersäure	17,90	2,36
4	Buttersäure	19,74	1,74
5	Isovaleriansäure	22,51	1,87
6	Valeriansäure	28,67	4,15
7	Capronsäure	45,16	11,12

Nach der Validierung der Methode eluierten nicht reproduzierbar ein Störpeak (SP1) zwischen Propionsäure (16,15min) und Isobuttersäure. Um auszuschließen, dass es sich hierbei um eine der flüchtigen Fettsäuren handelt, wurde eine Realprobe eines länger gelagerten anaeroben Schlammes mit den validierten flüchtigen organischen Säuren und mit Milchsäure, Ameisensäure und Methanol gespiked und vermessen (siehe Abbildung 4.1-1, Chromatogramm B). Der Störpeak (SP1) ist eindeutig keiner der Fettsäuren zuzuordnen. Er weist aber eine deutliche Überlappung mit der Isobuttersäure auf und ist auch von der Propionsäure nicht gut getrennt. Die Auflösung beträgt zu Propionsäure 1,2 und zur Isobuttersäure 0,97. Eine Methodenanpassung zeigte keine verbesserte Trennung. Da dieser Störpeak nur in vereinzelten Proben aufgetreten ist und in diesen Proben keine Isobuttersäure detektiert wurde, ist dieser Störpeak für die weiteren Untersuchungen nicht weiter relevant. Außerdem ist zu erkennen, dass zur Totzeit ebenfalls Matrixkomponenten (MP1/2) mit eluieren. Diese sind ebenfalls deutlich von den flüchtigen organischen Säuren separiert und stören die Messungen nicht.

**Tabelle 4.1-2 Selektivität in Matrix:** Retentionszeiten (RT) und Auflösung ( $R_s$ ) für die flüchtigen organischen Säuren ermittelt in Realmatrix aus Abbildung 5-2 Chromatogramm B.

Peak #	Substanz	Retentionszeit T [min]	Auflösung $R_s$
Me	Methanol	8,73	-
Mi	Milchsäure	11,07	5,81
AS	Ameisensäure	12,07	2,48
1	Essigsäure	13,84	4,18
2	Propionsäure	16,15	4,36
SP1	Störpeak	17,12	<b>1,20</b>
3	Isobuttersäure	17,90	<b>0,97</b>
4	Buttersäure	19,74	1,74
5	Isovaleriansäure	22,51	1,87
6	Valeriansäure	28,67	4,15
7	Capronsäure	45,16	11,12

#### 4.1.2 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurde wie in Kapitel 2.5.2 mit den Formeln 2.5-2 und 2.5-3 bestimmt. Hierzu wurde ein Blank vermessen und aus den Rohdaten das Rauschen bei den entsprechenden Retentionszeiten ermittelt. Die dazugehörigen Konzentrationswerte in  $\text{mL} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  und  $\text{mMol} \cdot \text{L}^{-1}$  sind in Tabelle 4.1-2 aufgeführt. Es zeigt sich, dass für die Bestimmung der flüchtigen organischen Säuren eine ausreichende Empfindlichkeit besteht.

**Tabelle 4.1-3 LOD/LOQ:** Berechnete Nachweis- und Bestimmungsgrenze der einzelnen flüchtigen organische Säure mittels S/N-Methode aus dem Blindwert-Rauschen einer Realmatrix

Substanze	mL·L <sup>-1</sup>		mg·L <sup>-1</sup>		mmol·L <sup>-1</sup>	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ
Essigsäure	0,0085	0,0085	0,0089	0,0089	0,1483	0,1483
Propionsäure	0,0085	0,0085	0,0084	0,0084	0,1133	0,1134
Isobuttersäure	0,0094	0,0094	0,0090	0,0090	0,1025	0,1027
Buttersäure	0,0094	0,0095	0,0092	0,0092	0,1030	0,1032
Isovaleriansäure	0,0096	0,0097	0,0090	0,0090	0,0874	0,0876
Valeriansäure	0,0097	0,0098	0,0091	0,0091	0,0883	0,0884
Capronsäure	0,0099	0,0099	0,0092	0,0093	0,0793	0,0797

#### 4.1.3 Linearität

Für die Bestimmung der Linearität für die verwendete Methode wurden sechs Mix-Standardlösungen im Konzentrationsbereich von 0,01 bis 5 mL·L<sup>-1</sup> hergestellt und vermessen. Die entsprechenden g·L<sup>-1</sup> und mmol·L<sup>-1</sup> sind für die einzelnen Säuren in Tabelle 4.1-3 aufgeführt. Wie in Tabelle 4.1-3 zu erkennen ist, erfüllen alle Analyten das geforderte Bestimmtheitsmaß von R=0,999 im Konzentrationsbereich von 0,01 bis 2 mL·L<sup>-1</sup>. Der ursprünglich erwartete Messbereich von 0,01 bis 5 mL·L<sup>-1</sup> zeigt nur für Essigsäure einen ausreichenden linearen Zusammenhang mit R= 0,9994 (siehe Tabelle 4.1-5). Dementsprechend wurden die linearen Arbeitsbereiche wie in Tabelle 4.1-4 abgebildet definiert und verwendet. Die dazu gehörigen Diagramme sind in den Abbildungen 4.1-2 und 4.1-3 aufgezeigt.

**Tabelle 4.1-4 Linearität:** Regressionkoeffizient der einzelnen flüchtigen organischen Säuren für den Konzentrationsbereich von 0,01-2 mL·L<sup>-1</sup> und 0,01-5 mL·L<sup>-1</sup>

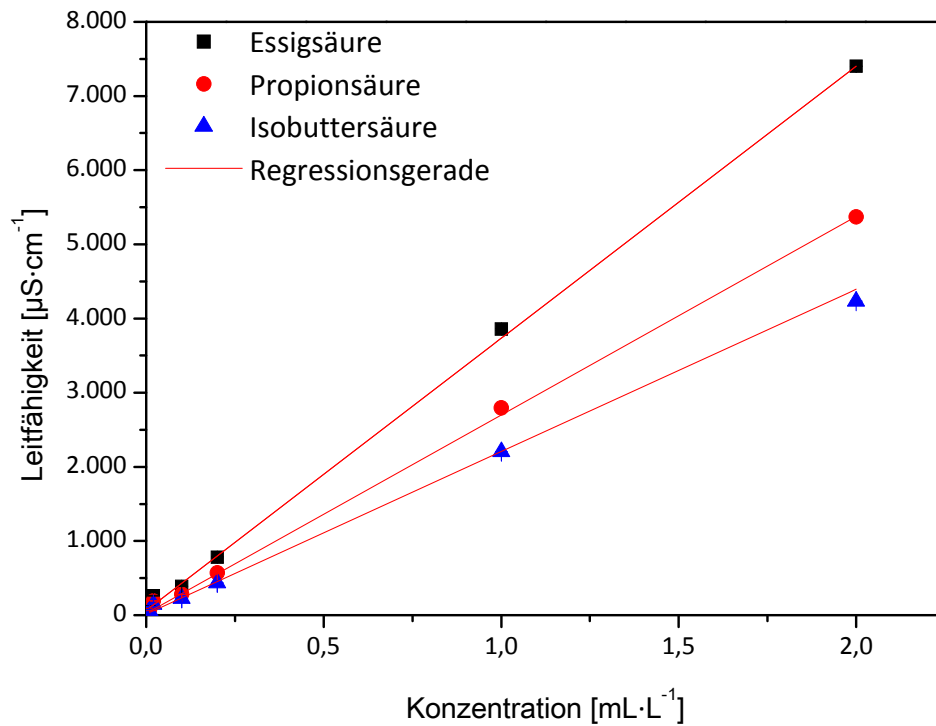
Substanze	Konzentration [mL·L <sup>-1</sup> ]		Linearer Arbeitsbereich [mL·L <sup>-1</sup> ]
	0,01 bis 2	0,01 bis 5	
Essigsäure	0,9994	0,9994	0,01 bis 5
Propionsäure	0,9994	0,9973	0,01 bis 2
Isobuttersäure	0,9994	0,9875	0,01 bis 2
Buttersäure	0,9994	0,9898	0,01 bis 2
Isovaleriansäure	0,9990	0,9868	0,01 bis 2
Valeriansäure	0,9995	0,9828	0,01 bis 2
Capronsäure	0,9995	0,9857	0,01 bis 2

**Tabelle 4.1-5 Standards Linearität:** Konzentrationen der einzelnen Kalibrierstandard der flüchtigen organischen Säuren in  $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$  und  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 

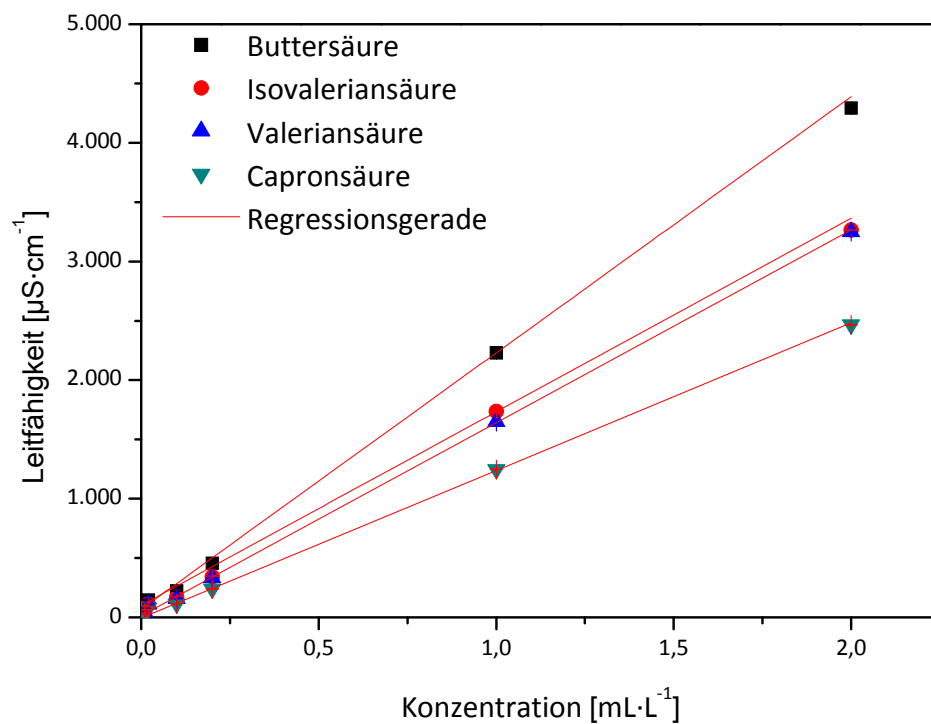
Soll	Essigsäure		Propionsäure		Buttersäure		Isobuttersäure	
$[\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}]$	$[\text{g}\cdot\text{L}^{-1}]$	$[\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}]$	$[\text{g}\cdot\text{L}^{-1}]$	$[\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}]$	$[\text{g}\cdot\text{L}^{-1}]$	$[\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}]$	$[\text{g}\cdot\text{L}^{-1}]$	$[\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}]$
0,100	0,105	1,749	0,099	1,336	0,096	1,090	0,097	1,101
0,200	0,210	3,497	0,198	2,673	0,192	2,179	0,198	2,247
0,500	0,525	8,743	0,495	6,682	0,480	5,448	0,495	5,618
1,000	1,050	17,485	0,990	13,364	0,960	10,895	0,990	11,236
2,000	2,100	34,971	1,980	26,728	1,920	21,791	1,980	22,472
5,000	5,250	87,427	4,950	66,821	4,800	54,477	4,950	56,180

Soll	Valerinsäure		Isovalerinsäure		Capronsäure	
$[\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}]$	$[\text{g}\cdot\text{L}^{-1}]$	$[\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}]$	$[\text{g}\cdot\text{L}^{-1}]$	$[\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}]$	$[\text{g}\cdot\text{L}^{-1}]$	$[\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}]$
0,100	0,093	0,911	0,093	0,906	0,093	0,801
0,200	0,186	1,821	0,198	1,939	0,186	1,601
0,500	0,465	4,553	0,495	4,847	0,465	4,003
1,000	0,930	9,106	0,990	9,693	0,930	8,006
2,000	1,860	18,212	1,980	19,387	1,860	16,013
5,000	4,650	45,529	4,950	48,467	4,650	40,032



**Abbildung 4.1-2 IC Linearität:** Kalibriergeraden von Essigsäure, Propionsäure und Isobuttersäure im Konzentrationsbereich von 0,01 bis  $2\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ .



**Abbildung 4.1-3 Linearität:** Kalibriergeraden von Buttersäure, Isovaleriansäure, Valeriansäure und Capronsäure im Konzentrationsbereich von 0,01 bis  $2\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ .

#### 4.1.4 Richtigkeit

Die sechs unabhängig voneinander hergestellten Proben wurden jeweils doppelt vermessen. Aus allen Messwerten wurden die Mittelwerte der Konzentration und die Abweichungen vom Sollwert ermittelt. Für die Beurteilung der Richtigkeit gilt, dass der Sollwert mit der vorgegebenen Wahrscheinlichkeit innerhalb des Vertrauensbereich (z.B. 95 %) liegt wenn  $t \leq t_{\text{Tabelle}}$  ist. Bei einer Wahrscheinlichkeit von 95 % und einer 6-fach-Bestimmung liegt der t-Tabelle-Wert bei 2,571. Sowohl die prozentuale Richtigkeit als auch die ermittelten t-Test Werte zeigen eine hohe Richtigkeit der Methode an. Die prozentuale Richtigkeit liegt zwischen 99,9 und 96,3 %, alle t-Werte liegen unter den geforderten Tabellenwerten. Die einzelnen Werte sind in der Tabelle 4.1-5 aufgeführt.

**Tabelle 4.1-6 Richtigkeit:** Prozentuale Richtigkeit und berechnete t-Test Analyse Werte

Säure	Richtigkeit [%]	t-Wert
Essigsäure	98,7	0,70
Propionsäure	97,9	1,03
Isobuttersäure	96,8	1,59
Buttersäure	99,6	0,25
Isovaleriansäure	99,9	0,06
Valeriansäure	96,3	1,93
Capronsäure	97,3	1,33

#### 4.1.5 Präzision

Es wurden sowohl die Systempräzision als auch die Methodenpräzision wie in 2.5.5 beschrieben bestimmt. Für die Systempräzision sollte die Abweichung bei unter 2 % liegen [115]. Für die Methodenpräzision sollte die relative Standardabweichung kleiner 5 % betragen [115]. Für alle Messwerte wurden die Grenzwerte eingehalten. Die einzelnen Ergebnisse sind in Tabelle 4.1-6 aufgeführt.

**Tabelle 4.1-7 Präzision:** Ergebnisse der System- & Methodenpräzision

Säure	Systempräzision [%]	Methodenpräzision [%]
Essigsäure	0,29	4,52
Propionsäure	0,27	4,81
Isobuttersäure	0,16	4,90
Buttersäure	0,03	4,24
Isovaleriansäure	0,42	4,02
Valeriansäure	1,25	4,68
Capronsäure	1,26	4,97

#### 4.1.6 Robustheit

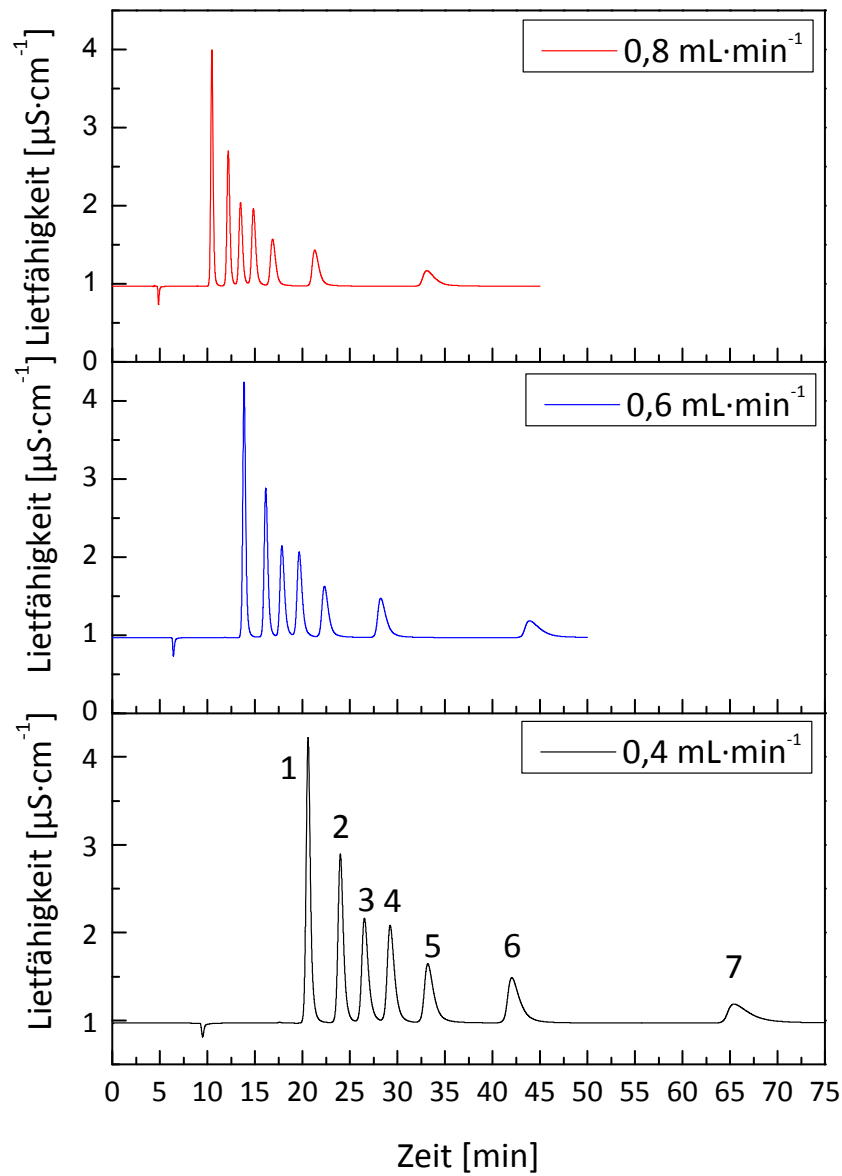
Wie unter 2.5.6 beschrieben, gibt es unterschiedliche Parameter, welche einen Einfluss auf die Robustheit einer chromatographischen Methode haben. Dafür wurden drei unterschiedlichen Fließgeschwindigkeiten ( $0,4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ;  $0,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ;  $0,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) als MethodenvARIABLE getestet, als Parameter wurden Retentionszeit und Auflösung der jeweiligen Peakpaare verwendet. In Tabelle 4.1-6 sind die einzelnen Auflösungen aufgeführt, Abbildung 4.1-5 zeigt ein Chromatogramm-Overlay. Es zeigt sich, dass die Auflösung mit sinkender Fließgeschwindigkeit größer wird. Dies liegt an der längeren Verweilzeit in der Trennsäule und dem damit einhergehenden häufigeren Massenübergang zwischen stationärer und mobiler Phase. Zusätzlich führt es dazu, dass breitere Peaks und längere Retentionszeiten erzielt werden. Eine Senkung der Fließgeschwindigkeit auf  $0,4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  führt hier annähernd zu einer Verdoppelung der Analysenzeit, was nicht gewünscht ist. Nichtsdestotrotz erfüllen alle drei Fließgeschwindigkeiten-Variationen die geforderte Auflösung von mindesten 2,5, was auf eine robuste Methode schließen lässt.

**Tabelle 4.1-8 Robustheit:** Ergebnisse der Robustheitsmessung

Peak Paare	Auflösung R [ $0,4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ]	Auflösung R [ $0,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ]	Auflösung R [ $0,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ]
ES / PS	4	4	3
PS / iBS	6	3	4
iBS / BS	6	3	4
BS / iVS	7	6	4
iVS / VS	6,4	4,8	5,3
VS / CS	10,5	8	8,4

ES=Essigsäure; PS=Propionsäure; iBS=Isobuttersäure; BS=Buttersäure; iVS=Isovaleriansäure; VS=Valeriansäure, CS=Capronsäure





**Abbildung 4.1-4 IC-Robustheit:** Overlay von drei Chromatogrammen mit unterschiedlichen Fließgeschwindigkeiten (0,4, 0,6 und 0,8 mL·min<sup>-1</sup>). Essigsäure (1) Propionsäure (2) Isobuttersäure (3) Buttersäure (4) Isovaleriansäure (5) Valeriansäure (6) Capronsäure (7)

## 4.2 Methodenentwicklung und Validierung zur Bestimmung von QACs mittels LC-MS/MS

Im nachfolgenden Kapitel wird die Methodenentwicklung zur Bestimmung von QACs mittels HPLC-MS/MS und die diesbezüglichen Ergebnisse der Validierung der entwickelten Methode gemäß der theoretischen Grundlagen aus Kapitel 2.5 (S. 47) dokumentiert.

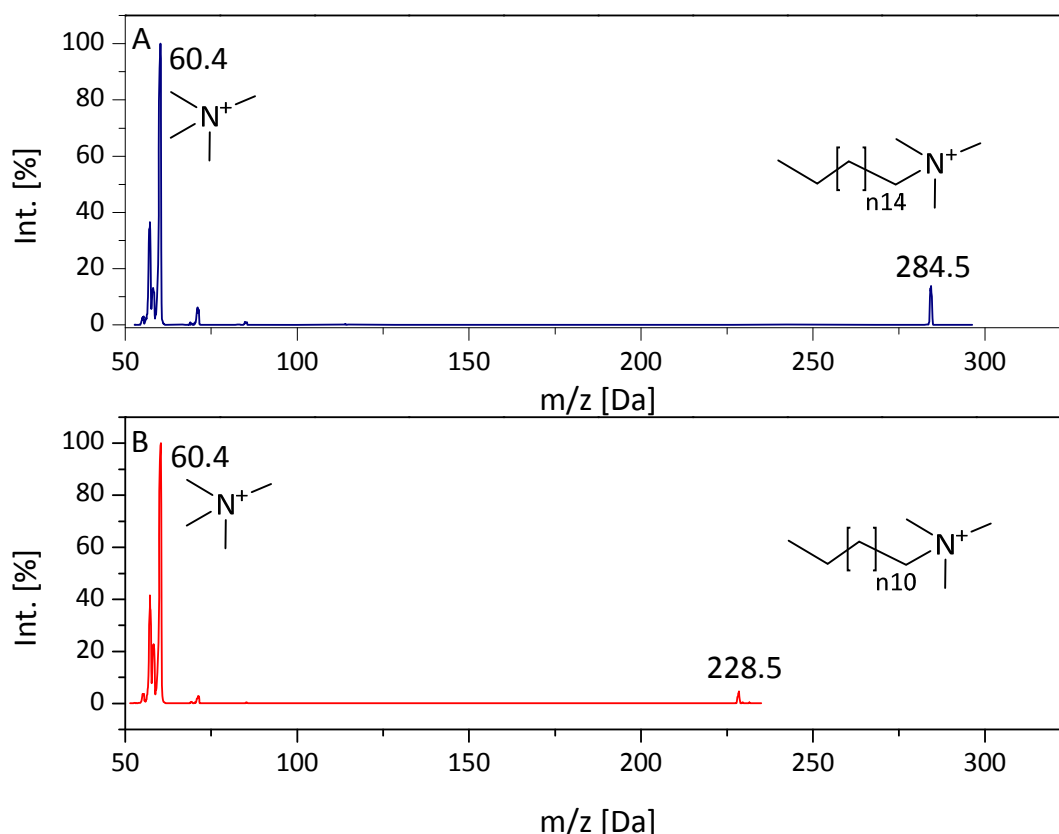
### 4.2.1 Massenspektren

Für die Aufzeichnung der Massenspektren in einem Tandem-Massenspektrometer wie dem hier verwendeten ABSciex 2000QTrap, wird der erste Quadrupol (Q1) auf das Masse-Ladungs-Verhältnis (engl. mass/charge,  $m/z$ ) der Mutterionen (engl. *precursor ion*) eingestellt. Hierzu verwendet man den *Single-Ion-Mode* (SIM). Anschließend werden in der Kollisionszelle (Q2) die *Mutterionen* fragmentiert und gelangen in den dritten Quadrupol (Q3 oder QTrap). Dieser wird im *Scan-Mode* betrieben und die entstandenen Fragment-Ionen einzeln aufgelöst detektiert.

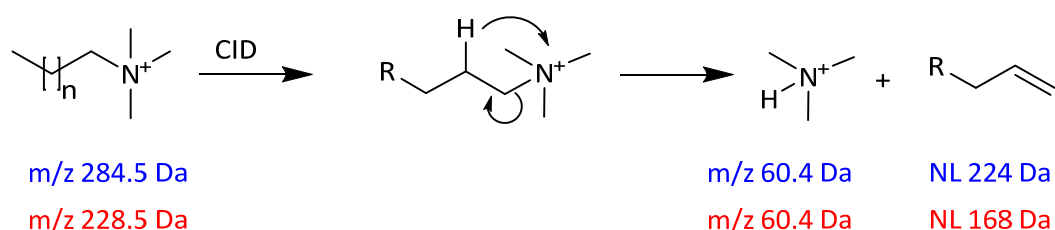
#### 4.2.1.1 Dodecyl-trimethylamin / Hexadecyl-trimethylamin

Das Masse-Ladungs-Verhältnis der Mutterionen von Dodecal-trimethylamin (ATMA-C12) und Hexadecyl-trimethylamin (ATMA-C16) entspricht der Molmasse der beiden Moleküle, da es sich hierbei um bereits positiv geladene Moleküle handelt. Von den *Mutterionen* wurde das entsprechende Massenspektrum aufgezeichnet (Abbildung 5.3-1). Hierfür wurde die Kollisionsenergie (engl. *collision energie*, CE) so eingestellt, dass das Fragment-Ion die höchste Intensität hat und das Mutterion <20 %. Dies erhöht die Empfindlichkeit, für die spätere *Multi-Reaktion-Monitoring* (MRM) Methode.

Sowohl ATMA-C12 als auch ATMA-C16 haben beide das gleiche Fragment-Ion  $m/z$  60,4 Da. Dies lässt auf eine Fragmentierung zwischen dem quaternären Stickstoff und der jeweiligen Alkylkette schließen. Des Weiteren kann man anhand der Stickstoffregel bestätigen, dass das Fragment-Ion  $m/z$  60,4 Da ein Stickstoffatom besitzen muss. Da die abgespaltete Alkylkette keine funktionelle Gruppe besitzt, welche eine Ladung besitzen könnte, ist eine neutrale Abspaltung (engl. *neutral loss* NL) am wahrscheinlichsten. Bei der *collision induced dissociation* (CID) können zwar auch Radikale entstehen [122, 123] dies wurde für ATMA-C12 und ATMA-C16 aber nicht detektiert. Ein möglicher Fragmentierungsmechanismus für beide Substanzen ist in Abbildung 5.3-2 dargestellt. Die kovalente Bindung zwischen Stickstoff und Alkylkette bricht hierbei auf und es bildet sich eine Doppelbindung an der Alkylkette. Hierdurch lagert sich ein Wasserstoffatom der zweiten  $\text{CH}_2$ -Gruppe des Alkylrestes um und wandert zum Ammonium-Ion. Neben dem bereits erwähnten Fragment mit dem Masse-Ladungs-Verhältnis 60,4 Da entstehen die neutralen Fragmente mit 168 Da und 224 Da.



**Abbildung 4.2-1 Massenspektren ATMA-C12/16:** Massenspektrum A, ATMA-C16 mit dem Mutterion  $m/z$  284.5 Da und dem Fragment-Ion  $m/z$  60.4 Da. Massenspektrum B, ATMA-C12 mit dem Mutterion  $m/z$  228.5 Da und dem Fragment-Ion  $m/z$  60.4 Da

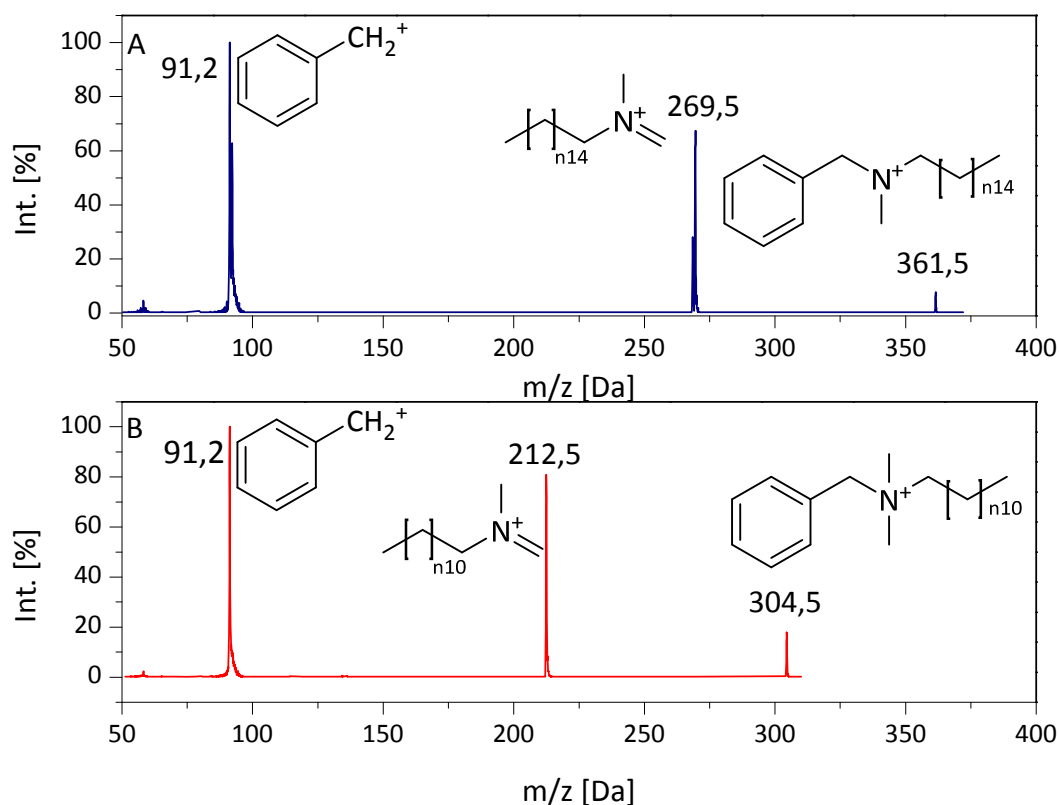


**Abbildung 4.2-2 Fragmentierung ATMA-C12/16:** Fragmentierungsmechanismus von ATMA-C12 und ATMA-C16 durch CID Fragmentierung in der Kollisionszelle mit den Fragment-Ionen  $m/z$  60.4 Da und den beiden neutralen Fragmenten 224 Da und 168 Da.

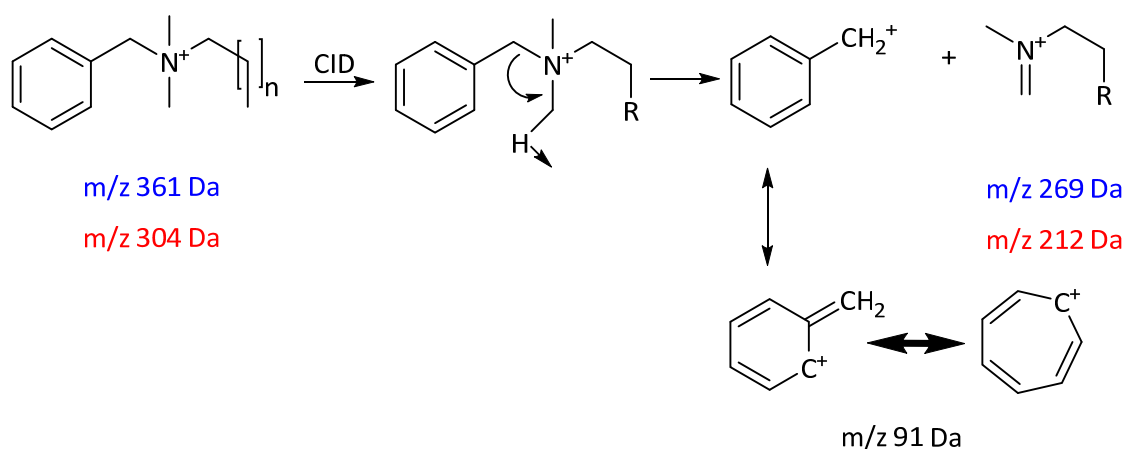
#### 4.2.1.2 Benzylododecyldimethylamin / Benzylhexadecyldimethylamin

Wie in Abbildung 4.2-3 zu sehen, entspricht das Masse-Ladungs-Verhältnis von BDMA-C12 und BDMA-C16 den Molekülmassen  $m/z$  284,5 Da und  $m/z$  228,5 Da. Durch die vorhandene Ladung ist keine zusätzliche Protonierung nötig. Des Weiteren ist zu sehen, dass BTMA-C12 und BTMA-C16 Fragment-Ionen bilden mit  $m/z$  91,2 Da und  $m/z$  269,5 Da sowie  $m/z$  91,2 Da und  $m/z$  212,5 Da. Hierbei wird eine CID-induzierte Spaltung der kovalenten C-N-Bindung erreicht (engl. *C-N cleavage*). Dabei lagert sich die Bindung um und generiert, unter Abspaltung eines Wasserstoffatoms, eine Methylgruppe am Stickstoff. Aus energetischer Sicht wird die hier auftretende C-N-Spaltung an der Benzylgruppe bevorzugt, da das entstehende Benzylum-Ion durch den  $\pi$ -Effekt und den  $^+M$ -Effekt

stabilisiert wird. Benzylum-Ionen entstehen häufig bei der Fragmentierung von aromatischen Verbindungen, welche eine Benzylgruppe haben. Es ist davon auszugehen, dass das in Abbildung 4.2-3 gezeigte Fragment  $m/z$  91 Da eine Umlagerungsreaktion durchführt und das noch stabilere Tropylium-Ions bildet, welches in Abbildung 4.2-4 gezeigt wird [123]–[125]. Ein ähnliches Verhalten hatte auch Ferre et al. [123] postuliert.



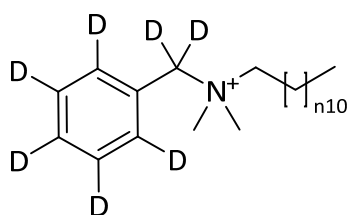
**Abbildung 4.2-3 Massenspektren BDMA-C12/C16:** Massenspektrum A, BDMA-C16 mit dem Mutterion  $m/z$  284,5 Da und dem Fragment-Ion  $m/z$  60,4 Da. Massenspektrum B, BDMA-C12 mit dem Mutterion  $m/z$  228,5 Da und dem Fragment-Ion  $m/z$  60,4 Da



**Abbildung 4.2-4 Fragmentierung BDMA-C12/16:** Fragmentierungsmechanismus von BDMA-C12 und BDMA-C16 durch CID Fragmentierung in der Kollisionszelle mit den Fragment-Ionen  $m/z$  91,1 Da,  $m/z$  269 Da und  $m/z$  212 Da und der Umlagerung des Benzylum-Ion zum Tropylium-Ions.

#### 4.2.1.3 Interner Standard

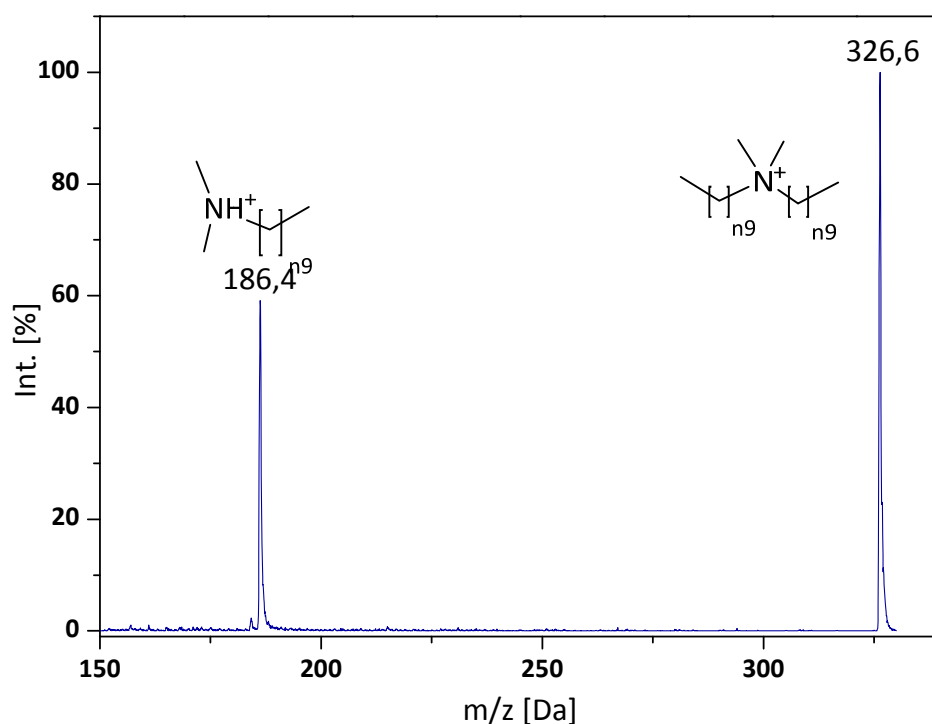
Bei der Elektrospray-Ionisation (ESI) sind interne Standards von hoher Bedeutung, da Matrix bedingte Suppressionen des Analytsignale ein häufig auftretendes Problem darstellen (engl. *ion suppression*). Hierbei stören die co-eluierenden Matrixbestandteile die Ionisation der Analyten. Hauptgrund sind nicht flüchtige Komponenten (z.B. Salze, Ionenpaarreagenzien etc.), die die Bildung der Tropfen im ESI-Prozess stören und somit eine verringerte Ausbeute an Analytionen verursachen. Interne Standards (ITSD) sollten daher möglichst zur gleichen Zeit wie die Analyten eluieren, da sonst diese Effekte nicht kompensiert werden. Besonders gut geeignet sind daher isotoopenmarkierte Standards [126]–[128]. Hierbei werden zum Beispiel eines oder mehrere der Analytmoleküle mit stabilen Isotopen markiert (SIL, engl. *stable isotope labeling* oder *ID isotopic dilution*). Als stabiler Isotopenmarker wird hierfür meistens Deuterium im Austausch für Wasserstoff verwendet, was zu einem Massenschift  $m/z + 1 \cdot n_D$  führt. In der vorliegenden Arbeit wurde D<sub>7</sub>-Benzyl-dodecyl-dimethyl-amin verwendet. Hierbei sind alle Wasserstoffatome des Benzylrestes durch Deuterium ausgetauscht worden. Folglich wird als Precourser Ion  $m/z$  311,5 Da detektiert und als Fragment Ionen  $m/z$  212,5 Da und  $m/z$  98,2 Da.



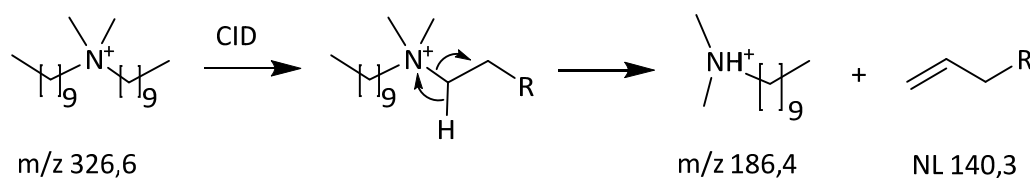
**Abbildung 4.2-5 Strukturformel ITSD:** Strukturformel des interne Standards D<sub>7</sub>-Benzyl-dodecyl-dimethyl-amin

#### 4.2.1.4 Didodecyl-dimethylammonium

Wie in Abbildung 4.2-6 zu sehen, bildet DDMA-C10 neben dem Precourser-Ion ebenfalls nur ein Fragment-Ion mit  $m/z$  186,4 Da. Da kein zweites Fragment-Ion zu erkennen ist, kann angenommen werden, dass wir es mit einer neutral Abspaltung (engl. *neutral loss NL*) zu tun haben. Hierbei wird, ähnlich wie bei ATMA-C12 und ATMA-C16, eine der Alkylketten abgespalten. Die kovalente Bindung zwischen Stickstoff und Alkylkette bricht hierbei auf und es bildet sich eine Doppelbindung an der Alkylkette. Hierdurch lagert sich ein Wasserstoffatom der zweiten CH<sub>2</sub>-Gruppe des Alkylrestes um und wandert zum Ammonium-Ion. Neben dem bereits erwähnten Fragment mit dem Masse-Ladungs-Verhältnis  $m/z$  186,4 Da entsteht das neutrale Fragment mit 140 Da.



**Abbildung 4.2-6 Massenspektrum DDMA-C10:** DDMA-C10 mit dem Mutterion  $m/z$  326,6 Da und dem Fragment-Ion  $m/z$  186,4 Da.



**Abbildung 4.2-7 Fragmentierung DDMA-C10:** CID induzierte Fragmentierungsmechanismus von DDMA-C10 mit dem Mutterion  $m/z$  326,6 Da und dem Fragment-Ion  $m/z$  186,4 Da.

#### 4.2.2 MRM Methode

Quantitative Analysen sind für die Ermittlung des Abbaugrades o.ä. unumgänglich. In der Tandem-Massenspektrometrie hat sich hierfür die Betriebsweise im Multi-Reaktion-Monitoring etabliert. Hierbei werden die aus dem Massenspektrum abgeleiteten Fragmente in Kombination mit dem Mutterion vermessen. Hierzu wird der Q1 auf die  $m/z$  des Mutterion eingestellt. In Q2, welcher als Reaktionszelle verwendet wird, werden die Mutterionen mittels Stickstoff fragmentiert. Im anschließenden Q3 werden die  $m/z$  der Fragmente eingestellt. Die Kombination aus Mutterion und Fragment Ionen macht den MRM-Modus sehr empfindlich und selektiv. Für jedes Molekül wurden die massenspektrometrischen Bedingungen optimiert, und letztere in der folgenden Tabelle 4.2-1 aufgelistet.

**Tabelle 4.2-1 MRM-Methode:** Einstellung des Massenspektrometers für den MRM-Modus m/z Precursor Ion, m/z Fragment-Ion Cone Voltage (CV), Kollisionsenergie (CE), Quelltemperatur (T), Declustering Potential (DP)

Substanz	Precursor [m/z]	Fragment [m/z]	CE [V]	CV [V]	DP [V]	T [°C]
ATMA-C12	228,5	60,4	50	4500	50	200
ATMA-C16	284,5	60,4	50	4500	47	200
BDMA-C12	304,5	91,2	50	4500	50	200
BDMA-C16	361,5	91,2	50	4500	50	200
DDMA-C10	326,6	186,4	50	4500	50	200
BDMA-C12-D7	311,5	98,2	50	4500	50	200

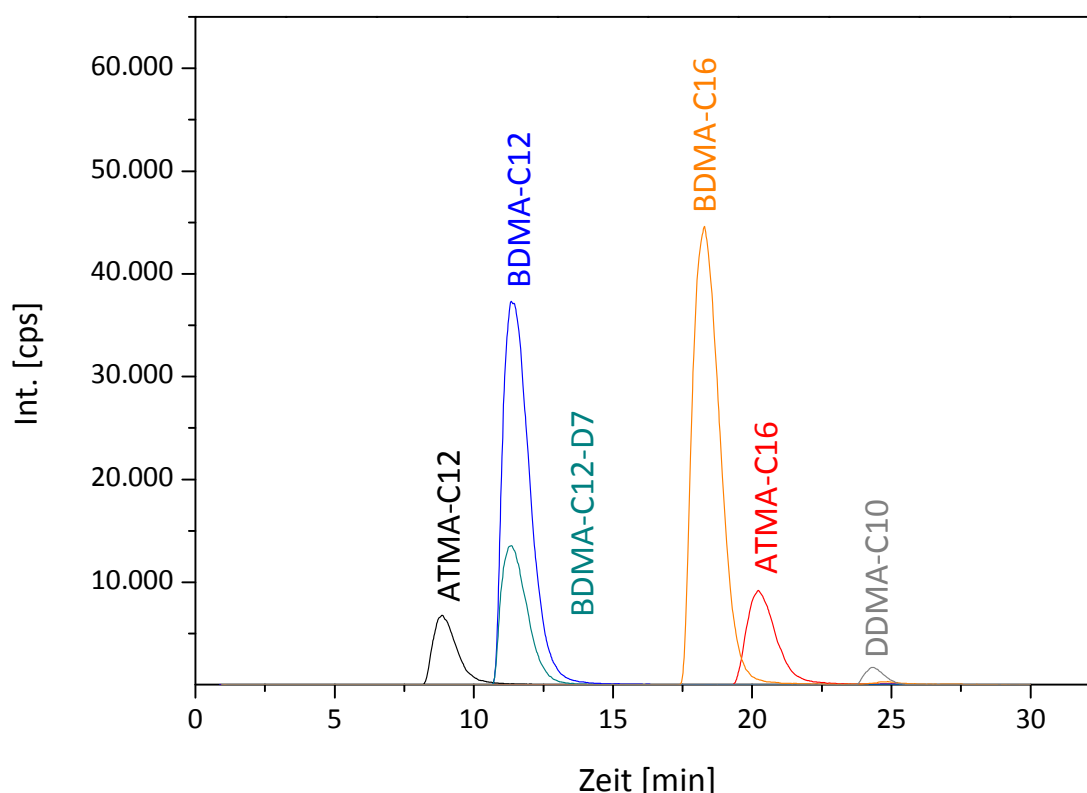
#### 4.2.3 Chromatographische Methode

Für eine simultane Analyse der Monoalkylamine (ATMA-C12 / ATMA-C16), der Benzylamine (BDMA-C12 und BDMA-C16) sowie des Dealkylamin (DDMA-C10) wurde folgende HPLC-Methode entwickelt. Zunächst wurde eine Prontosil –C18 Säule verwendet und ein Gradientensystem erstellt. Als Eluenten wurden Wasser mit 0,1 % Ameisensäure (Eluent A) und Methanol mit 0,1 % Ameisensäure (Eluent B) verwendet. Die Geräteparameter sind in Tabelle 4.2-2 aufgeführt. Die einzelnen Validierungsparameter sind in den folgenden Kapitel beschrieben. In Abbildung 4.2-8 wird ein Beispielchromatogramm der Methode gezeigt.

**Tabelle 4.2-2 HPLC-Methode:** Einzelparameter der HPLC Methode für die chromatographische Trennung von ATMA-C12, ATMA-C16, BDMA-C12, BDMA-C16, DDMA-C10 und des ITSD BDMA-C12-D7

Parameter		Zeit [min]	Eluent A [%]
Säule	Prontosil –C18 Säule	0	40
Säulendimension	120 x 4 mm	10	30
Partikelgröße	3 µm	18	30
Flussrate	0,5 mL·min <sup>-1</sup>	20	10
Temperatur	60°C	22	10
Injektionsvolumen	5 µL	28	40
Eluent A	Wasser mit 0,1 % Ameisensäure	30	40
Eluent B	Methanol mit 0,1 % Ameisensäure		

Gradienten-Programm



**Abbildung 4.2-8 LC-MS/MS Chromatogramm:** HPLC Chromatogramm von Dodecyltrimethylammonium (ATMA-C12), Benzyl-dodecyltrimethylammonium (BDMA-C12), interner Standard D7-Benzyl-dodecyltrimethylammonium (BDMA-C12-D7), Benzyl-hexadecyltrimethylammonium (BDMA-C16), Hexadecyltrimethylammonium (ATMA-C16), Didecyltrimethylammonium (DDMA-C10)

#### 4.2.4 Validierung der Methode zur Bestimmung von quaternären-Ammoniumverbindungen aus festen und flüssigen Proben mittels LC-MS/MS

Im nachfolgenden Kapitel werden die Ergebnisse der Validierung der entwickelten Methode zur Bestimmung von QACs mittels LC-MS/MS gemäß der theoretischen Grundlagen aus Kapitel 2.5 (S. 47) dokumentiert und diskutiert.

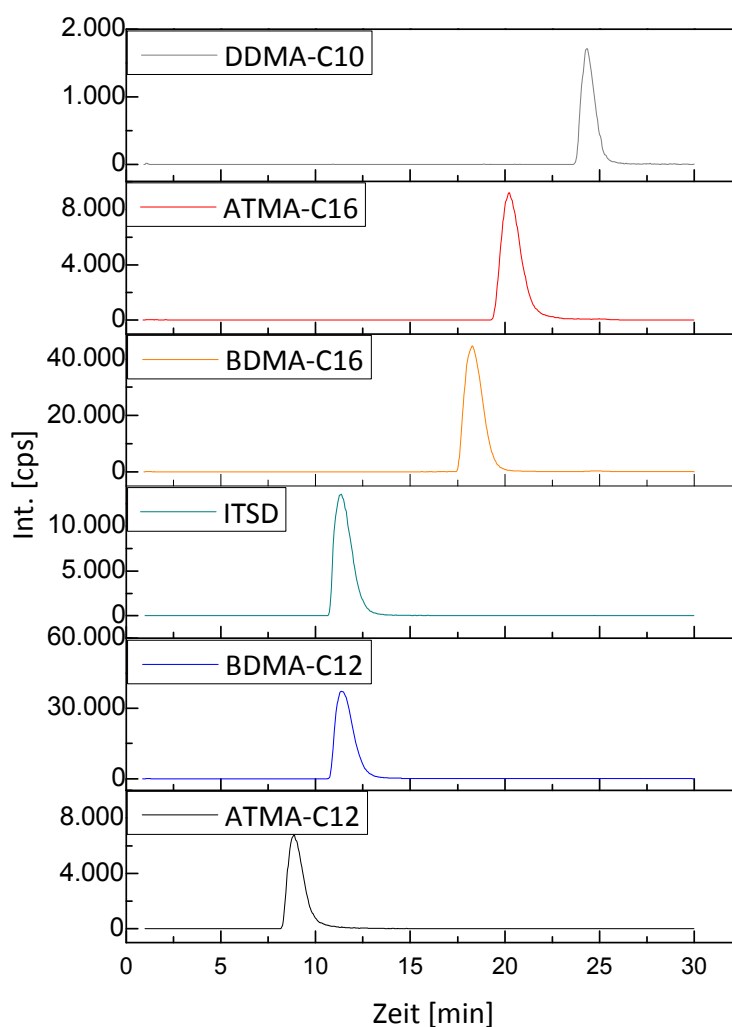
##### 4.2.4.1 Selektivität

Wie bereits erwähnt zeichnet sich der MRM-Modus durch seine hohe Selektivität und Empfindlichkeit aus. In der Tandem Massenspektrometrie ist der MRM-Modus der selektivste und spezifischste Modus und eignet sich besonders für die Target-Analytik. Moderne hochauflösende Massenspektrometer (engl. *high resolution mass spectrometer*) wie Orbitraps oder Time of Flights (ToF) gelten, durch ihre hohe Auflösung und Genauigkeit als noch spezifischer. Durch die gesteigerte Spezifität sind diese Massenspektrometer ebenfalls sehr selektiv. Zur Untersuchung der Selektivität wurde eine Modelllösung hergestellt, welche alle Analyten in unterschiedlichen Konzentrationen enthält, um die Beeinflussung der einzelnen Analyten untereinander auszuschließen. Diese Lösung



wurde im MRM-Modus vermessen und jedes einzelne Ionenchromatogramm (engl. *extracted ion chromatogram*) ausgewertet.

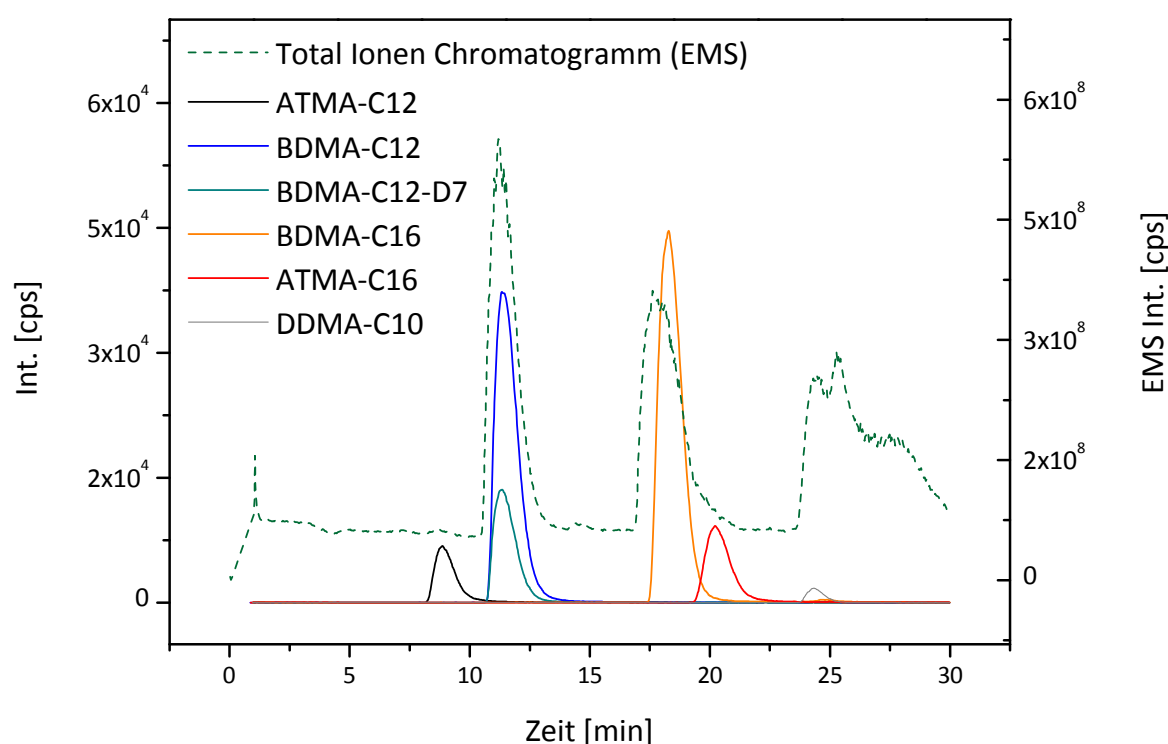
Wie in Abbildung 4.2-9 gezeigt, kann jede einzelne Ionenspur separat voneinander ausgewertet werden. Dies ist vor allem bei den internen Standards BDMA-C12-D7 und BDMA-C12 sehr wichtig. Hier ist eine chromatographische Trennung zum einem nicht möglich, da beide Substanzen sich nur im Molekulargewicht unterscheiden und keine Polaritätsunterschiede besitzen. Zum anderen ist eine chromatographische Trennung der beiden Substanzen nicht gewollt, da eventuelle Ionensuppressionen kompensiert werden sollen. Hierzu ist eine zeitgleiche oder zeitnahe Elution erforderlich.



**Abbildung 4.2-9 Extracted ion chromatogram:** Chromatogramm mit den einzelnen Ionenspuren von Dodecyltrimethylammonium (ATMA-C12), Benzyl-dodecyl-dimethylammonium (BDMA-C12), internen Standard (ITSD) D7-Benzyl-dodecyl-dimethylammonium, Benzyl-hexadecyl-dimethylammonium (BDMA-C16), Hexadecyltrimethylammonium (ATMA-C16), Didecyl-dimethylammonium (DDMA-C10).

Als nächstes wurde die Probe im MRM-Modus und im EMS-Modus (engl. *enhanced mass spectrum*) vermessen und verglichen. Anders als im MRM-Modus wird beim EMS-Modus keine spezifische  $m/z$  analysiert, sondern der Quadrupol wird im Scan-Modus betrieben und somit ein  $m/z$  Bereich (z.B. 50-400 Da) abgesannt. Somit detektiert man jedes Molekülion, welches am Detektor ankommt. Diese unspezifische Aufzeichnung führt aber zu einem sehr starken Signalrauschen, was in Abbildung 4.2-10 erkennbar ist. Die gestrichelte Linie ist das gesamte Signal des EMS-Scans. Vergleicht man die Intensität der Basislinie, wird dies besonders deutlich. Die Basislinie hat bereits eine Intensität von ca.  $1 \times 10^8$  cps. Im Vergleich dazu hat die Basislinie des MRM-Modus eine Intensität von annähernd 0 cps. Dies führt dazu, dass Signale wie ATMA-C12, ATMA-C16 und DDMA-C10 im EMS-Modus überlagert werden und somit nicht oder nur sehr gering detektiert werden.

Die entwickelte Methode, welche im MRM-Modus durchgeführt wird, hat somit ein hohes Maß an Selektivität. Unter einer Vielzahl von Signalen können die spezifischen  $m/z$ -Verhältnisse der Analyten detektiert und getrennt voneinander analysiert werden.



**Abbildung 4.2-10 MRM-Chromatogramm und EMS-Chromatogramm:** Chromatogramm mit den einzelnen Ionenspuren der Analyten, (farbig) aufgezeichnet im MRM-Modus. Totales Ionenchromatogramm (TIC) gemessen im EMS-Modus (gestrichelt).

Ein weiteres Maß für die Selektivität, ist eine vollständige Auftrennung der Analyten im Chromatogramm. Dies ist zwar bei einer MRM-Methode, in der man jede Ionenspur separat auswerten kann, nicht immer zwingend erforderlich, aber bei einer Methode mit einer geringen

Anzahl von Analyten, wie in der vorliegenden Arbeit, trotzdem sinnvoll. Hierfür wurde die Auflösung der einzelnen Peakpaare zueinander gemäß Formel 2.5-1 ermittelt. Dabei gilt, wie bereits in Kapitel 2.5.1 beschrieben, ein Peakpaar als vollständig getrennt, wenn  $R \geq 1,5$  ist. Die einzelnen Ergebnisse sind in Tabelle 4.2-3 aufgeführt. Die Mindestanforderung von  $R \geq 1,5$  wurde für alle Peakpaare erreicht.

**Tabelle 4.2-3 Selektivität:** Retentionszeiten (RT) und Auflösung ( $R_s$ ) für die einzelnen Peakpaare gemäß Formel 2.5-1

Substanz	Retentionszeit [min]	$R_s$
Dodecyl-trimethylammonium	8,9	-
Benzyl-dodecyl-dimethyl-amonium	11,4	1,54
D7-Benzyl-dodecyl-dimethyl-amonium	11,4	1,54
Benzyl-hexadecyl-dimethyl-amonium	18,3	3,72
Hexadecyl-trimethylammonium	20,4	1,50
Didecyl-dimethylammonium	24,4	3,02

#### 4.2.4.2 Nachweis und Bestimmungsgrenze

Für alle fünf Analyten wurden die Nachweis- und Bestimmungsgrenze anhand der Leermethode (DIN 32645) ermittelt. Analog zur Bestimmung von LOQ und LOD für die Ionenchromatographie wurde hierbei das Signal-Rausch-Verhältnis (engl. *signal-to-nois*,  $S/N$ ) gemäß den Formeln 2.5-2 und 2.5-3 ermittelt. Die einzelnen Grenzwerte sind in Tabelle 5.1-4 aufgeführt. Es zeigt sich, dass für alle Analyten eine ausreichende Empfindlichkeit vorhanden ist.

**Tabelle 4.2-4 LOD/LOQ:** Berechnete Nachweis- und Bestimmungsgrenze der QACs mittels  $S/N$ -Methode aus dem Blindwert

Substanze	Konzentration [ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ]		Konzentration [ $\mu\text{Mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ]	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ
ATMA-C12	0,18	0,40	0,67	1,52
ATMA-C16	0,52	1,17	1,63	3,65
BDMA-C12	$4 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-4}$	0,04	0,10
BDMA-C16	0,05	0,12	0,13	0,30
DDMA-C10	0,33	0,76	1,00	2,34

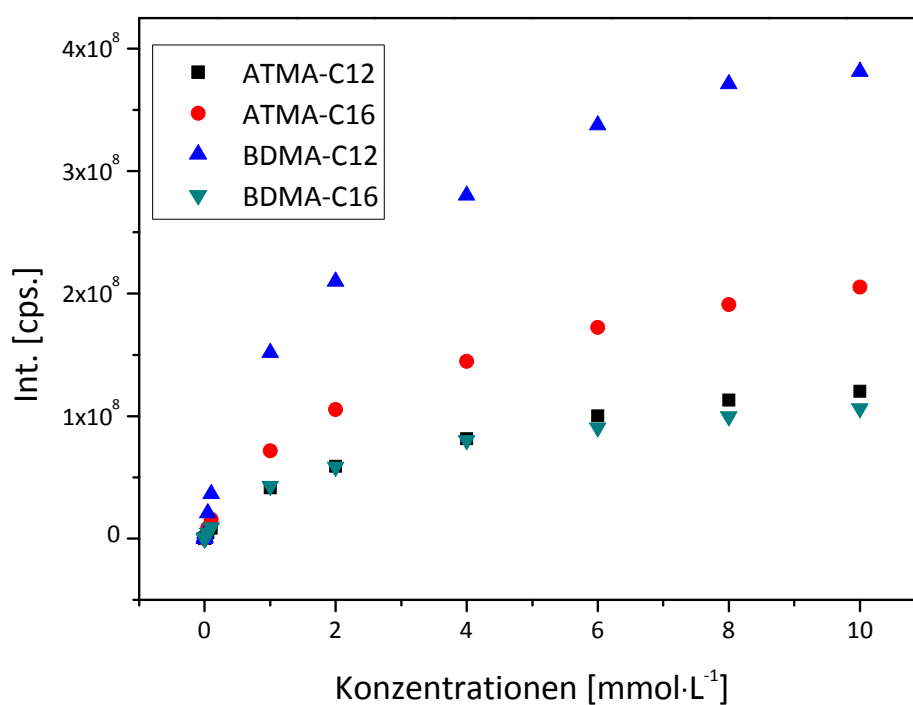
#### 4.2.4.3 Linearität

Es wurden sowohl die Linearität als auch der lineare Arbeitsbereich der Methode ermittelt. Hierfür wurden Standardlösungen im Konzentrationsbereich von  $0,01 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  bis  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  hergestellt und vermessen. Jeder Standard wurde als Einzelstandard ohne Matrix in Methanol hergestellt. Wie unter dem Kapitel Selektivität gezeigt wurde, hat die Matrix keinen erheblichen Einfluss auf das Messsignal bei Verwendung der MRM-Methode. Eine Kalibrierung mittels matrixfreien Standards (externe Kalibrierung) ist somit zulässig, da keine Verschiebung der Linearität zu erwarten ist. In Abbildung 4.2-11 sind alle vermessenen Proben aufgetragen. Es zeigt sich deutlich, dass ab einer Konzentration von  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  kein linearer Zusammenhang mehr besteht. Der linearen

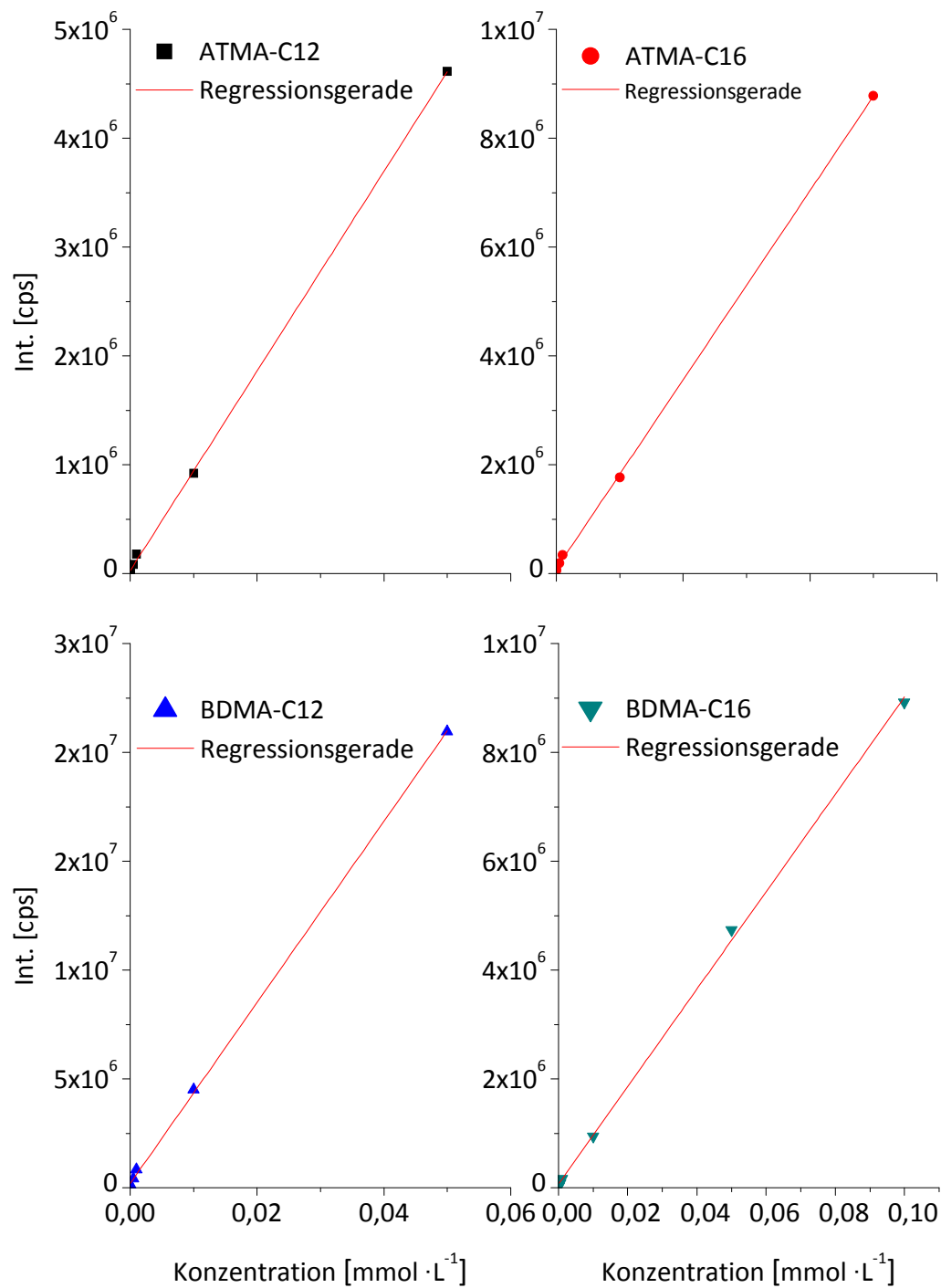
Zusammenhang von geforderten  $R \geq 0,999$  [115] wurde ermittelt und auf den Konzentrationsbereich von LOQ bis  $0,05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  festgelegt. Die einzelnen Regressionskoeffizienten sind in Tabelle 4.2-5 aufgeführt. Abbildung 4.2-12 zeigt die Kalibriergeraden der einzelnen Analyten.

**Tabelle 4.2-5 Linearität:** Regressionskoeffizienten der einzelnen Analyten innerhalb des linearen Arbeitsbereich von LOQ –  $0,05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  und bis  $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

Substanze	Konzentration [ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ]		Linearer Arbeitsbereich [ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ]
	LOQ-0,1	LOQ-0,05	
ATMA-C12	0,99800	0,99966	LOQ-0,05
ATMA-C16	0,99663	0,99977	LOQ-0,05
BDMA-C12	0,99506	0,99962	LOQ-0,05
BDMA-C16	0,99804	0,99900	LOQ-0,05



**Abbildung 4.2-11 Linearearbeitsbereich:** Ermittlung des linearen Zusammenhang zwischen Konzentration und Messsignal und Festlegung des Arbeitsbereiches für die LC-MS/MS Methode.



**Abbildung 4.2-12 Linearität:** Kalibriergerade von ATMA-C12, ATMA-C16, BDMA-C12 und BDMA-C16 im linearen Arbeitsbereich von LOQ bis 0,05 mmol·L<sup>-1</sup>. BDMA-C16 ist bis 0,1 mmol·L<sup>-1</sup> abgebildet.

#### 4.2.4.4 Wiederfindung und Richtigkeit

Die Wiederfindung und Richtigkeit wurde für die Aufarbeitung der flüssigen Proben durchgeführt da, nur die flüssigen Proben für eine quantitative Analyse des Abbaus der QACs verwendet wurden. Hierzu wurden eine Referenzlösung und sechs Probelösungen mit der jeweils gleichen Konzentration von  $0,05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  unabhängig voneinander hergestellt. Von der Referenzlösung wurden 0,5 mL der Lösung und 15  $\mu\text{L}$  des internen Standards in ein Vial überführt und homogenisiert. Die Probe wurde sechs Mal vermessen und der Mittelwert der gemessenen Flächen als 100 % gewertet. Von den Probelösungen wurden 0,5 mL mit 15  $\mu\text{L}$  des internen Standards versetzt und über einen Spritzenfilter in ein Vial überführt. Alle Lösungen wurden zweimal vermessen. Nach jeder Messung der Referenz- und Probelösungen wurde ein Blank vermessen.

Folgendes Berechnungsschema wurde für die Korrektur mit internem Standard verwendet.

$$\text{Richtigkeit} = \left( \frac{Re_{ITSD}}{Re_{ITSD-Probe}} \right) * Re_{QAC \text{ Probe}} \quad \text{Formel 4-1}$$

Es zeigte sich bei der Auswertung, dass teilweise hohe Abweichungen von 68-160 % zwischen den einzelnen Proben lagen, was anhand des TIC vor allem auf das ESI-Spray zurückgeführt werden kann. Die Korrektur mittels internen Standards konnte diese hohen Abweichungen relativieren, so dass gemittelte Wiederfindungen von 96 bis 118 % erreicht werden konnten.

**Tabelle 4.2-6 Richtigkeit:** Mittels internen Standard korrigierte Richtigkeit und relative Abweichung der fünf getesteten Analyten

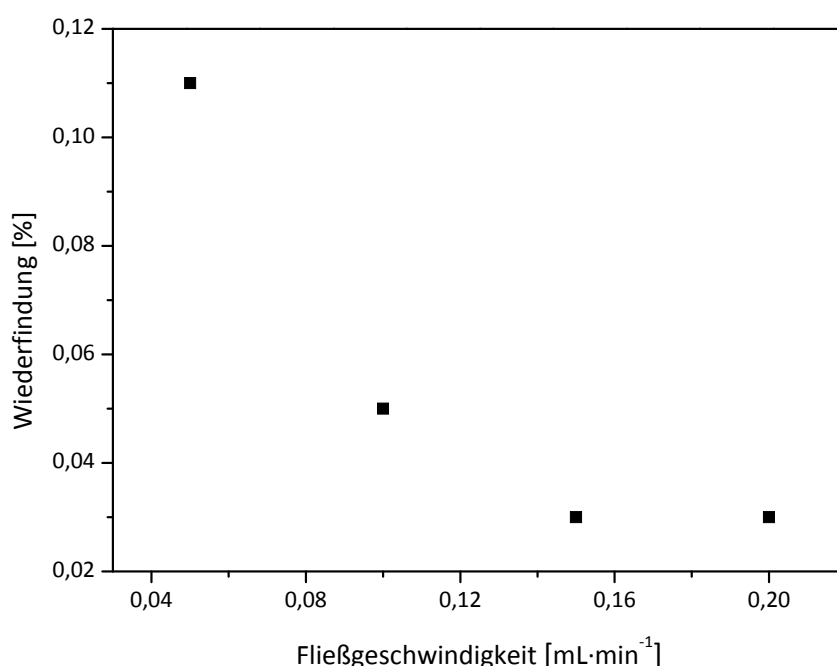
	<b>ATMA-C12</b>	<b>ATMA-C16</b>	<b>BDMA-C12</b>	<b>BDMA-C16</b>	<b>DDMA-C10</b>
Mittelwert [%]	117,7	107,8	114,6	96,0	98,9
RSD [%]	2,5	9,2	1,8	21,6	1,8

### 4.3 Onlinedialyse

Im nachfolgenden Kapitel werden die Arbeiten zur online Dialysetechnik als Probenvorbereitung für die Bestimmung von flüchtigen organischen Säuren in komplexen Matrices beschrieben.

#### 4.3.1 Bestimmung und Wiederfindung in Abhängigkeit zur Fließgeschwindigkeit

Die Wiederfindung (R) der Analyten liegt, laut Aussage des Herstellers Trace Analytics GmbH, im unteren Prozentbereich. Grund hierfür ist die hohe Verdünnung, welche in der Dialysesonde stattfindet. Eine Steigerung der Wiederfindung kann durch die technisch sehr aufwendige Stop-Flow-Methode erzielt werden. Dabei werden der Fluss der Akzeptorlösung und der Probe für eine definierte Zeit gestoppt, um eine möglichst hohe Diffusionszeit zu gewährleisten. Anschließend wird die höher konzentrierte Akzeptorlösung zum Messgerät transportiert und injiziert. Hierfür muss das genaue Transfervolumen bekannt sein und sichergestellt werden, dass sich Transfervolumen und Fließgeschwindigkeit nicht ändern. In der vorliegenden Arbeit wurde die *Stop-Flow*-Methode nicht verwendet, da die erhaltene Wiederfindung von ca. 1 % für die empfindliche Ionenchromatographie-Methode ausreichend war. Bei der *Continuous-Flow*-Methode kann durch einen möglichst geringen Volumenstrom eine höhere Diffusionszeit an der Dialysemembran erreicht werden. Bei großer Wegstrecke des Bypasses muss natürlich ein Kompromiss zwischen Wiederfindung und Analysenzeit gefunden werden. Am Beispiel von Essigsäure wurde daher dieses Optimum ermittelt. Wie in Abbildung 4.3-1 gezeigt ist, geht bei einer Fließgeschwindigkeiten von  $> 0,1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  die Wiederfindung gegen null. Somit ist die Diffusionszeit an der Membran nicht mehr ausreichend, um einen Analytübergang zu gewährleisten. Fließgeschwindigkeiten von  $< 0,1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  erhöhen zwar die Wiederfindung um über 50 %, die sehr geringe Fließgeschwindigkeit führt jedoch zu einer starken Verzögerung der Analysenzeit, da die Probe doppelt so lange im Bypass verweilt. Für die weiteren Versuche wurde die Fließgeschwindigkeit daher auf  $0,1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  festgelegt.



**Abbildung 4.3-1 online Dialyse:** Wiederfindung von Essigsäure mittels Onlinedialyse in Abhängigkeit von der Fließgeschwindigkeit.

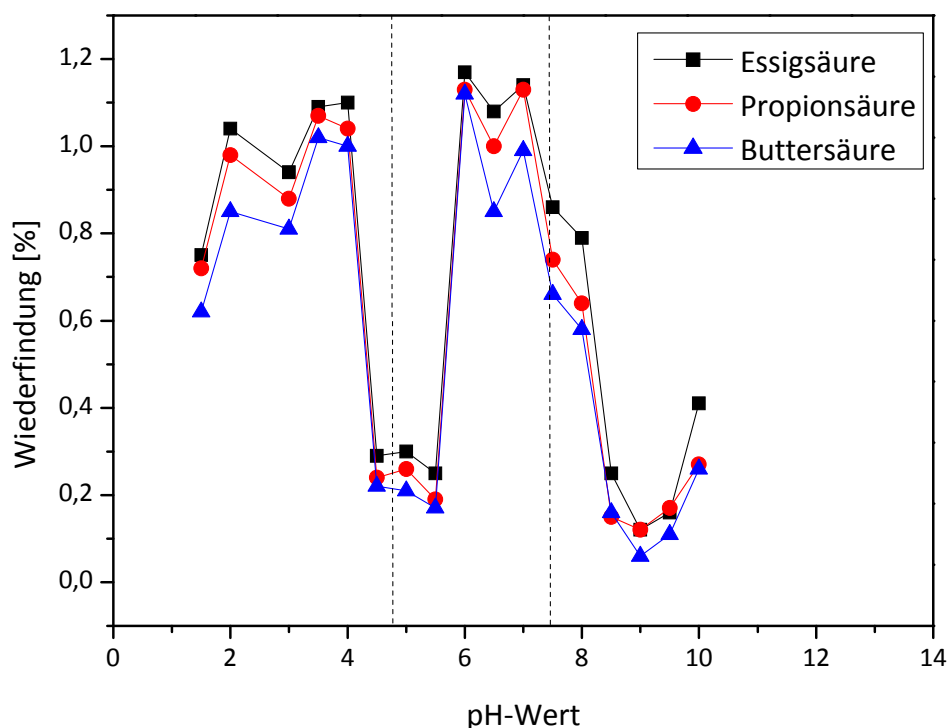
#### 4.3.2 Optimierung der Wiederfindung durch Variation des pH-Wertes der Akzeptorlösung.

Neben der Fließgeschwindigkeit hat auch der pH-Wert der Akzeptorlösung einen Einfluss auf die Wiederfindung. Dies wurde für Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure im pH-Bereich von 1,5 bis 10 getestet. Hierbei wurden bis zu fünf Mal größere respektive kleinere Messwerte bei unterschiedlichen pH-Werten ermittelt. Prinzipiell zeigten die drei getesteten organischen Säuren über den getesteten pH-Wertbereich das gleiche Migrationsverhalten, wobei bei steigender Unpolarität der Säure generell eine geringere Wiederfindung der Säure ermittelt wurde.

Die Wiederfindung im pH-Wert Bereich von 4,5 bis 5,5 weist eine deutliche Abweichung zu den Wiederfindungsoptimums im pH-Wert Bereich von 3,5 bis 4 und 6 bis 6,5 auf. Im pH-Wert-Bereich von 3,5 bis 4 liegen die Säuren gemäß Henderson-Hasselbach-Gleichung vollständig protoniert vor. Beim Übertreten der Säuremoleküle durch die Membran von der Analytlösung in die Akzeptorlösung ändert sich somit der Protonierungsgrad, was zu einer höheren osmotischen Triebkraft führt und somit auch zu einer verstärkten Migration. Dies gilt ebenfalls für den pH-Wert-Bereich von 6 bis 6,5, in dem die Säuren vollständig deprotoniert vorliegen. Hingegen entspricht der pH-Wert-Bereich von 4,5 bis 5,5 dem gleichen Protonierungsgrad in Analytlösung und Akzeptorlösung. In den pH-Wert-Bereichen von unter 4,5 und über 6,5 könnte es vorkommen, dass der Überschuss an  $H^+$  bzw.  $OH^-$  Teilchen zu einer Störung des osmotischen Migrationsvorgangs führt.



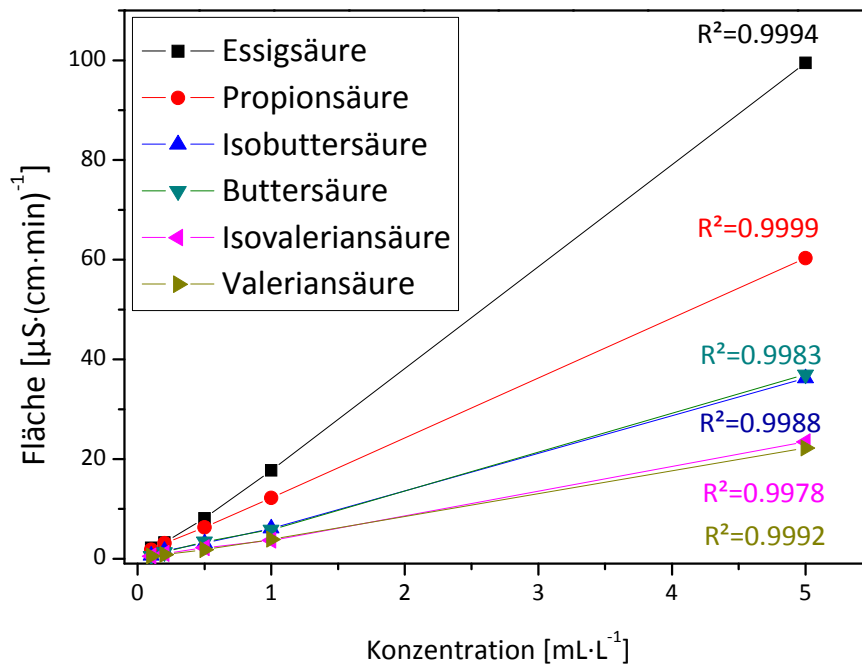
Reinstwasser, welches frisch hergestellt wird, hat einen pH-Wert von um 4, da sich  $\text{CO}_2$  aus der Luft in dem Reinstwasser löst und den pH-Wert senkt. Daher wurde für die folgenden Versuche der pH-Wert der Akzeptorlösung mit verdünnter NaOH auf einen pH-Wert von 6 bis 7 eingestellt.



**Abbildung 4.3-2 Onlinedialyse:** Wiederfindung von Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure mittels Onlinedialyse in Abhängigkeit vom pH-Wert der Akzeptorlösung.

#### 4.3.3 Validierung der Onlinedialyse

Zur Kalibrierung der Dialyse wurden die Essigsäure, Propionsäure, Isobuttersäure, Buttersäure, Isovaleriansäure und Valeriansäure im Konzentrationsbereich von  $0,2$  bis  $5 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$  kalibriert. Der linearer Regressionskoeffizient lag bei den getesteten Säuren im Bereich von  $R^2 = 0,9999$  bis  $0,9978$ . Das Detektionslimit lag bei  $0,1$  bis  $0,2 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $3,3$  bis  $9,8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Darüber hinaus wurde die Präzision der Methode bestimmt. Die *Interday*-Präzision lag bei  $2,7$  bis  $3,8 \%$  die *Intraday*-Präzision bei  $3,9$  bis  $6,1 \%$ .



**Abbildung 4.3-3 online Dialyse:** Kalibrierung von Essigsäure, Propionsäure, Isobuttersäure Buttersäure, Isovaleriansäure und Valeriansäure mittels Onlinedialyse

#### 4.3.4 Einsatz der Onlinedialyse in anaerober Realmatrix

Beim Einsatz der Dialysesonde im Reaktorsystem mit Realmatrix wurde dem Reaktor neben dem anaeroben Schlamm die zu testenden Fettsäuren zugesetzt. Es konnten keine Fettsäuren bei der Bestimmung detektiert werden. Um eine unzureichende Vermischung auszuschließen, wurde das Rührwerk nach Zugabe der Fettsäuren für einige Zeit auf die maximale Stufe eingestellt. Auch dies führte nicht zum gewünschten Erfolg. Beim Ausbau der Sonde musste festgestellt werden, dass die kleine Austauschfläche vor der Dialysemembran komplett mit Feststoff verblockt war und somit keine Analyt-Diffusion stattfinden konnte. In Folge dessen wurden verschiedene Positionen der Sonde im Reaktor ausprobiert. Dabei verblockte auch hier die Membran sofort. Somit ist festzustellen, dass die Dialyse sich zwar grundsätzlich hinsichtlich der Empfindlichkeit, Präzision und Wiederfindung auch bei kontinuierlicher Betriebsweise für die Analyse von FOS eignet, sich aber aufgrund der mechanischen Verblockung in dieser Form nicht verwenden lässt.

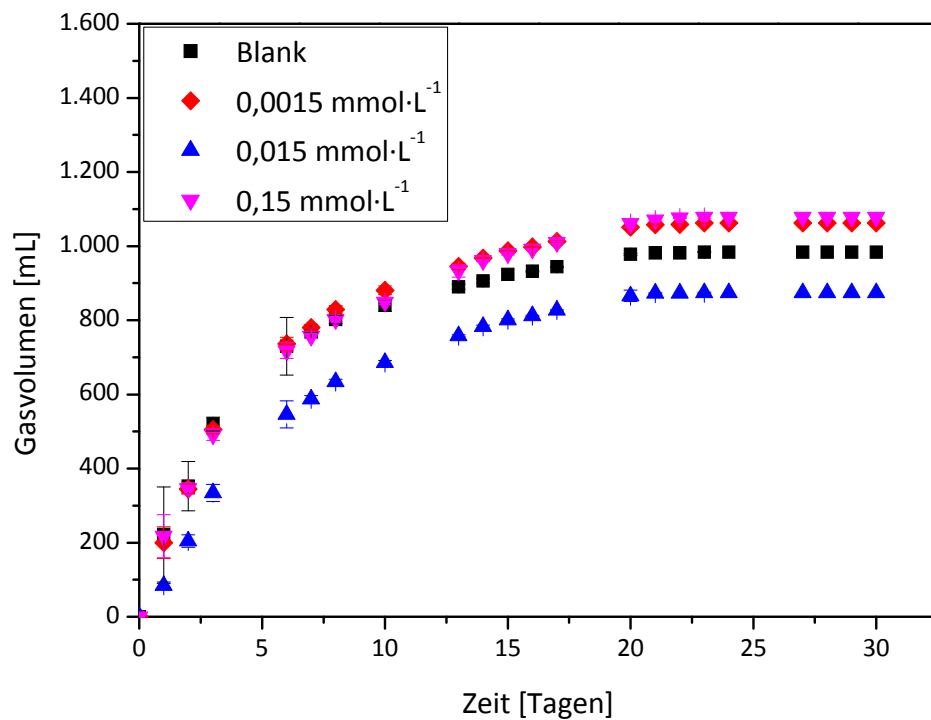
#### 4.4 Ergebnisse zum Einfluss von Glyphosat auf die Biogaserzeugung

Das Breitbandherbizid Glyphosat und glyphosathaltige Pflanzenschutzmittel sind in der deutschen Landwirtschaft sehr stark verbreitet. In einer bundesweiten Studie von 2012 ergab sich, dass auf 39 % der Ackerflächen in Deutschland Glyphosat eingesetzt wird [27]. Kritisch ist vor allem die Anwendung des Sikkationsverfahrens (Vorernteverfahrens), bei dem noch 7 bis 4 Tage vor der Ernte Glyphosat eingesetzt werden darf. Diese kurzfristige Anwendung vor der Ernte lässt vermuten, dass sie die Ursache für erhöhte Befunde von belasteten Futtermitteln oder Lebensmitteln sind [8]. Durch den Einsatz von Glyphosat beim Anbau von Mais zur Energiegewinnung ist somit ein Eintrag von Glyphosat und dessen Metabolit AMPA in Biogasanlagen denkbar. In den folgenden Abschnitten werden die Versuchsergebnisse zum Einfluss von Glyphosat und AMPA auf die anaerobe Mischkultur untersucht und diskutiert. Zunächst wurde in zwei Vorversuchen der zu testende Konzentrationsbereich ermittelt, in dem eine Hemmung von Glyphosat und AMPA auf Biomasse im anaeroben Milieu auftritt, und anschließend innerhalb dieses Bereichs sowohl der Effekt auf die Biogasbildungsraten als auch der Einfluss auf das Fettsäureprofil analysiert. Die Versuchsdurchführung wird in Kapitel 3.1 und die FOS-Analyse in Kapitel 3.3 beschrieben.

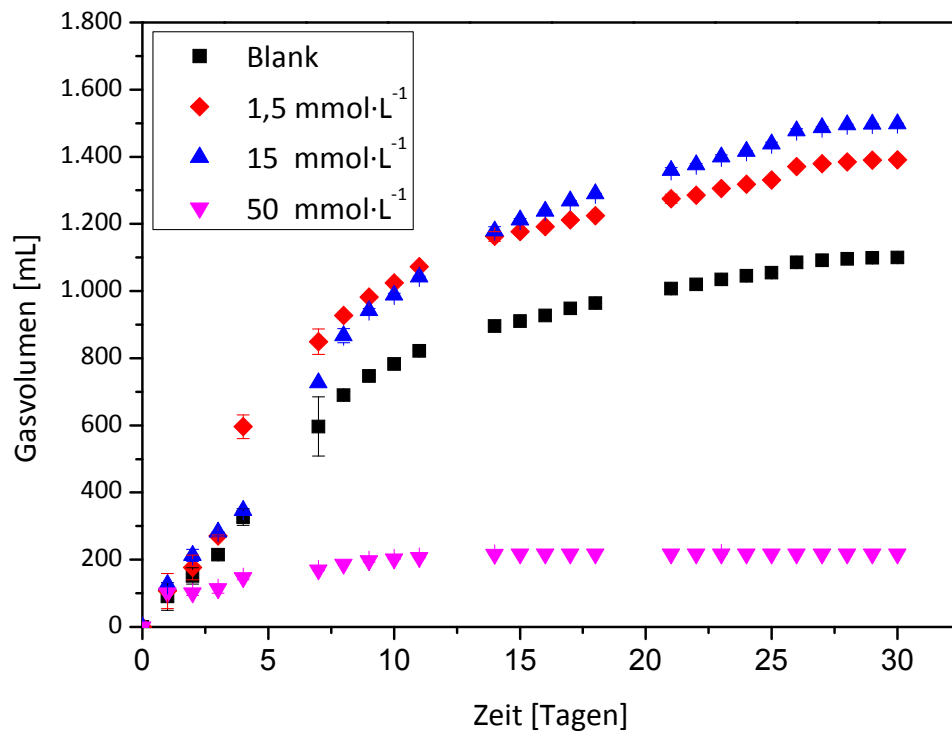
##### 4.4.1 Vorversuche zur Ermittlung der Hemmkonzentration von Glyphosat auf das anaerobe Milieu

Da es weder Daten zur Belastung von Glyphosat in Biogasanlagen gibt, noch Studien zum Einfluss von Glyphosat auf anaerobe Mischkulturen vorliegen, wurden im ersten Schritt Vorversuche durchgeführt, um Konzentrationen zu ermitteln, bei denen ein mikrobiologischer Effekt auf die anaerobe Mischkultur wirkt. Khalil et al. hat bereits Anfang der 1990er Jahre einige Versuche zum Einfluss von anthropogenen Stoffen auf anaerobe Mischkulturen durchgeführt [130, 131]. Das damals getestete Pestizid war Mancozeb, welches ein Breitbandfungizid ist (siehe Anhang). Khalil et al. ermittelten damals eine Hemmkonzentration von  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  (entspricht  $0,18 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) [129]. Basierend auf diesen Ergebnissen, wurde als erste Versuchsreihe mit Glyphosat die Konzentrationen von  $0,15$  bis  $0,0015 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  in logarithmischen Schritten getestet. Hierbei ist deutlich zu sehen, dass diese Konzentrationen keinen Einfluss auf die gesamte anaerobe Mischkultur besitzen. Die kumulierte Gasmenge der Testlösungen weichen vom Blank nur um -12 % und 8 % ab. Auch die Steigung innerhalb des linearen Bereichs der Anfangsphase weicht bei  $0,0015 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  und  $0,15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  nur um 2 % ab. Eine Hemmung von Glyphosat auf Mikroorganismenkulturen im anaeroben Milieu ist daher für diesen Konzentrationsbereich auszuschließen (siehe Abbildung 4.4-1). Bei der folgenden Versuchsreihe wurde die Konzentration daher logarithmisch erhöht und der Konzentrationsbereich von  $1,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  und  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  getestet. Die Auftragung der kumulierten Gasmenge ist in Abbildung 4.4-2 zu sehen. Die Gasmenge bei  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  entspricht nur ca. 20 % der des Blanks. Die Probe mit  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  zeigt somit eine Hemmung der Biogasproduktion.

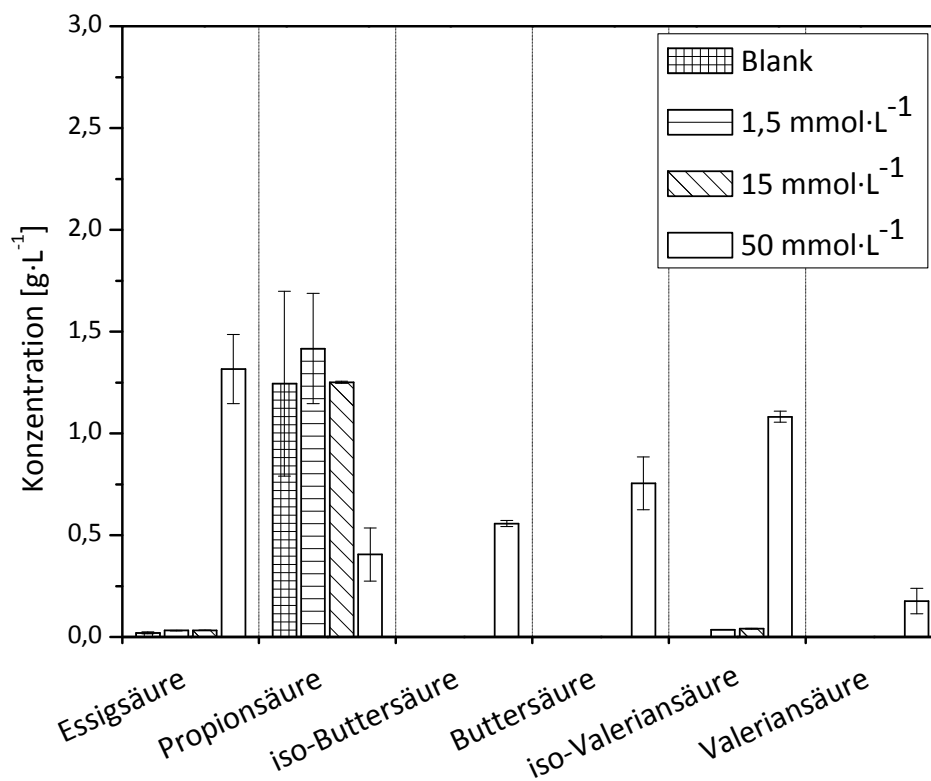
Die Analyse des Fettsäureprofils ergab, dass sich in der gehemmten Probe hohe Mengen an Essigsäure und Isovaleriansäure ( $>1 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ ) befanden (Abbildung 4.4-3). Zusätzlich waren auch die anderen langkettigen FOS vorhanden. Dies lässt auf eine gehemmte Umsetzung schließen, die alle beteiligten Mikroorganismen betrifft. In Kombination mit der hohen Konzentration an Essigsäure kann vermutet werden, dass es sich aber vor allem um eine Hemmung der Methanogenese (Archaeen) handelt, da die vorhandene Essigsäure nicht weiter abgebaut wurde.



**Abbildung 4.4-1 Glyphosat Screening:** Kumulative Messung der Biogasproduktionsrate in Gegenwart von Glyphosat im Konzentrationsbereich von 0,0015 bis 0,15  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$



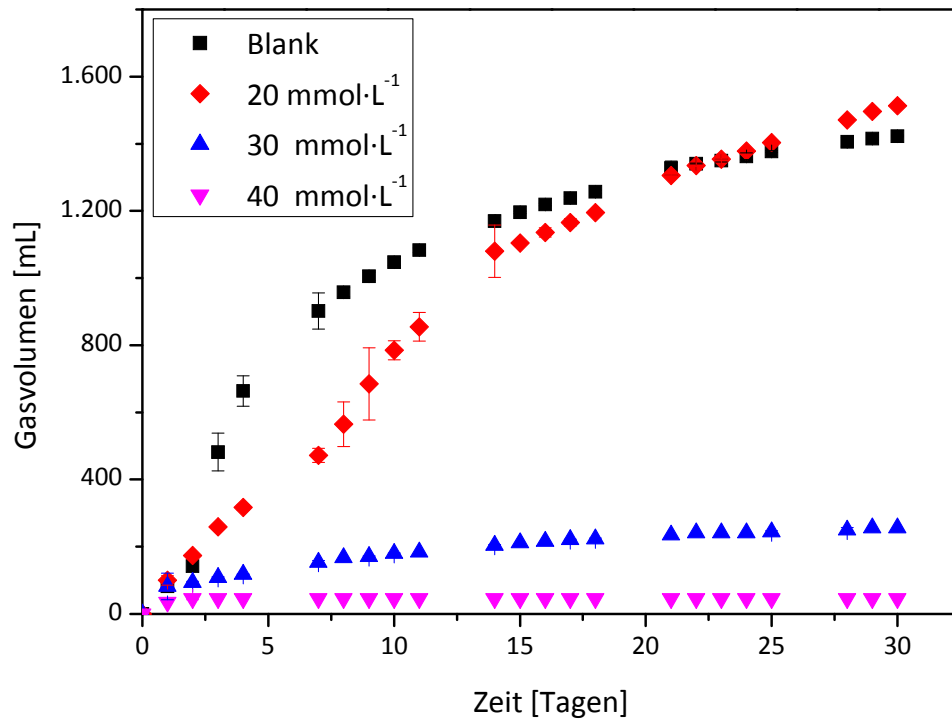
**Abbildung 4.4-2 Glyphosat Screening:** Gemittelte kumulative Messung (n=2) der Biogasproduktionsrate in Gegenwart von Glyphosat im Konzentrationsbereich von 1,5 bis 50 mmol·L<sup>-1</sup>



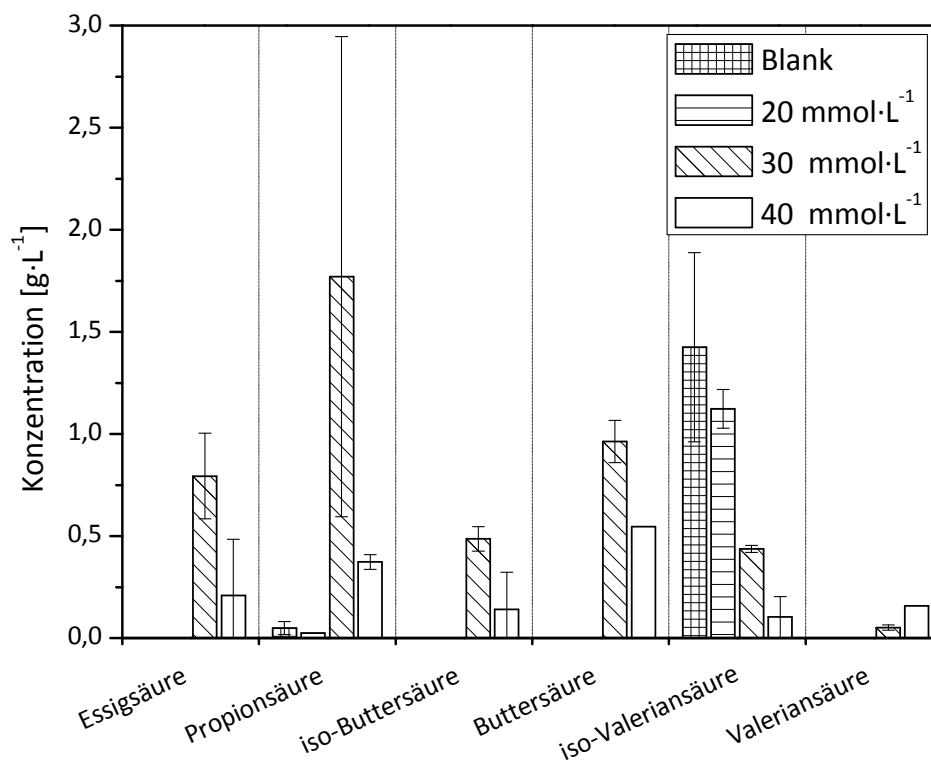
**Abbildung 4.4-3 Glyphosat Fettsäureprofil:** Konzentrationssauftragung (n=2) der flüchtigen organischen Säuren vermessen mittels Ionenchromatographie (n=2)

#### 4.4.2 Einfluss von Glyphosat auf die Biogaserzeugung im Konzentrationsbereich von 20 bis 40 mmol·L<sup>-1</sup>

Basierend auf den Ergebnissen der ersten beiden Glyphosat-Versuchsreihen wurden im Anschluss die Konzentrationen von 20 mmol·L<sup>-1</sup>, 30 mmol·L<sup>-1</sup> und 40 mmol·L<sup>-1</sup> getestet. Bei 20 mmol·L<sup>-1</sup> ist hier noch kein hemmender Einfluss auf die Biogasproduktion zu verzeichnen. Der Verlauf der Gasproduktion verhält sich analog zu den Versuchen bei 1,5 mmol·L<sup>-1</sup> und 15 mmol·L<sup>-1</sup>, bei denen sogar mehr Biogas erzeugt wurde als beim Blank. Dies könnte auf eine Verstoffwechselung des Glyphosats zurückzuführen sein. Interessant ist hierbei, dass bei der Glyphosatkonzentration von 20 mmol·L<sup>-1</sup> die Lag-Phase deutlich ausgeprägter ist, die Exponential-Phase jedoch später anfängt und nach der Versuchsdauer von 30 Tagen noch nicht vollständig abgeschlossen ist. Hierfür gibt es zwei mögliche Erklärungen. Zum einen könnte in der Anfangsphase primär Glyphosat abgebaut werden und erst im Anschluss daran das eigentliche Substrat Cellulose, mit dessen Abbau der Anstieg des Biogasvolumens einhergeht. Ein solcher Vorgang wird als Diauxie beschrieben und kann auftreten, wenn zwei unterschiedliche Substrate vorliegen. Hierbei wird zuerst das leichter abbaubare Substrat metabolisiert und erst nach vollständigen Aufbrauchen das zweite. Da dabei der Metabolismus für das zweite Substrat aktiviert werden muss, kommt es hier wie in Abbildung 4.4-4 zu einer kurzzeitigen zweiten Lag-Phase. Da Glyphosat besser löslich ist als Zellulose und somit schneller zellulär metabolisiert werden könnte, wäre eine Diauxie als Ursache möglich. Zum anderen könnte Glyphosat in der Anfangsphase hemmend auf z.B. die Archaeen wirken, welche dann im späteren Verlauf erst durch den enzymatischen Abbau (Hydrolyse) des Glyphosats ungehemmt Essigsäure zu CH<sub>4</sub> und CO<sub>2</sub> umsetzten (siehe Abbildung 2.3-1 Schritt 4). Die Auswertung des Fettsäureprofils zeigt noch einmal deutlich, dass keine Hemmung der enzymatischen Hydrolyse, der Acidogenese und der Acetogenese vorliegt, da bei den Proben mit 30 und 40 mmol·L<sup>-1</sup> alle Säuren, d.h. sowohl die langkettigen Fettsäuren als auch Essigsäure, vorhanden sind, was wiederum auf einen nicht vollständigen anaeroben Abbau der Cellulose schließen lässt.



**Abbildung 4.4-4 Glyphosat:** Gemittelte kumulative Messung (n=2) der Biogasproduktionsrate in Gegenwart von Glyphosat im Konzentrationsbereich von 20 bis 40 mmol·L<sup>-1</sup>



**Abbildung 4.4-5 Glyphosat Fettsäureprofil:** Konzentrationssauftragung (n=2) der flüchtigen organischen Säuren, vermessen mittels Ionenchromatographie (n=2)

#### 4.4.3 Einfluss des Glyphosatmetaboliten AMPA auf die Biogaserzeugung im Konzentrationsbereich von 20 bis 60 mmol·L<sup>-1</sup>

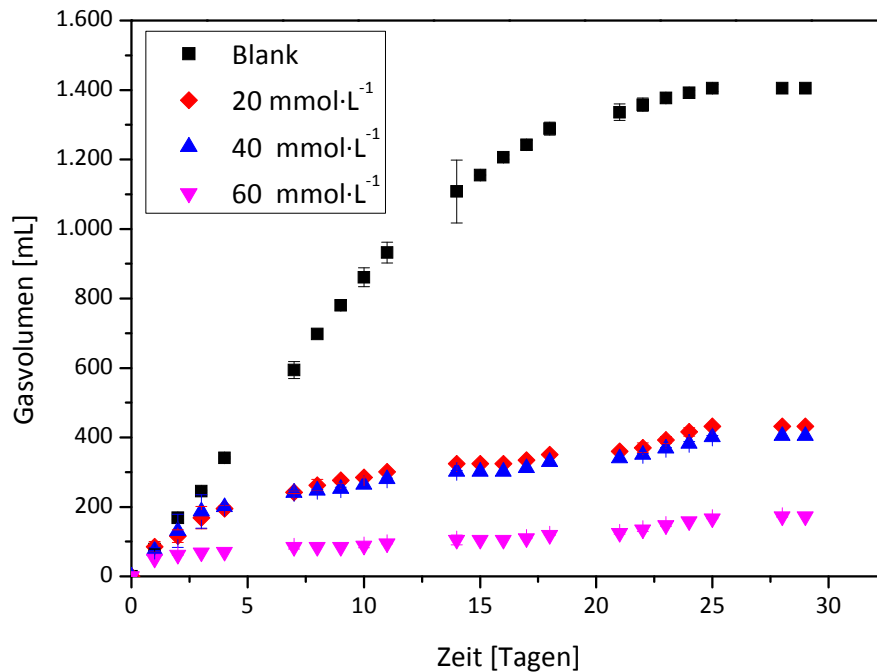
Glyphosat wird 1:1 in die Metaboliten AMPA und Glyoxylat umgesetzt. Da Glyoxylat vollständig in der Umwelt mineralisiert wird, wurde nur der Metabolit AMPA untersucht. Zwar wird auch AMPA weiter metabolisiert, allerdings deutlich langsamer, was auch die Befunde von AMPA in der Umwelt widerspiegeln. Unter der Annahme das AMPA einen geringeren Einfluss auf die anaerobe Mischkultur haben könnte, wurden die drei Konzentrationen von 20 mmol·L<sup>-1</sup>, 40 mmol·L<sup>-1</sup> und 60 mmol·L<sup>-1</sup> getestet. In Abbildung 4.4-6 sind die Gasratenproduktionen aufgetragen. Die vorherige Annahme, das AMPA einen geringeren Einfluss auf die Biogasproduktion hat, erwies sich als falsch. Im Gegensatz zu Glyphosat scheint AMPA auch im Konzentrationsbereich von 20 mmol·L<sup>-1</sup> bereits einen hemmenden Einfluss auf die Mischkultur zu haben. Die Auswertung des Fettsäureprofils (Abbildung 4.4-7) gestaltete sich schwierig, da im Gegensatz zu den vorherigen Versuchen auch der Blank eine hohe Konzentration an Essigsäure und Propionsäure aufweist. Allerdings zeigt sich ein erheblicher Unterschied zwischen Blank und den Proben in Bezug auf die längerkettigen Fettsäuren, die im Blank nur minimal vorhanden sind. AMPA hat somit einen stärkeren Einfluss auf die Acidogenese, die für die Bildung von den längerkettigen Fettsäuren verantwortlich ist.

#### 4.4.4 Zusammenfassung Glyphosat und AMPA

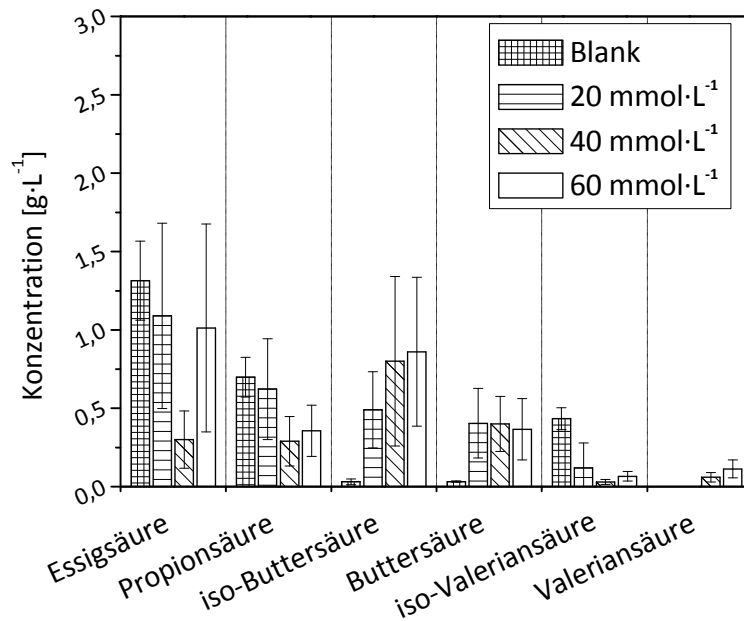
Die Ergebnisse zeigen, dass die von Khalil ermittelten Hemmkonzentrationen von Mancozeb (Strukturformel siehe Anhang b) für anaerobe Mischkulturen nicht auf Glyphosat und AMPA zu übertragen sind. Sowohl für Glyphosat als auch für AMPA liegen die hemmenden Konzentrationen mit 30 mmol·L<sup>-1</sup> für Glyphosat und 20 mmol·L<sup>-1</sup> für AMPA um mehr als das 100 fache höher als für Mancozeb. Anhand der Fettsäureprofile (Abbildung 4.4-5 und 4.4-7) konnte ermittelt werden, dass bei Einsatz von Glyphosat überwiegend die Methanogene beeinflusst werden, da bei den Proben, die Glyphosat enthielten, trotz einer verringerten Biogasproduktion alle FOS ermittelt werden konnten und sich die Essigsäure auf Werte um 0,25-0,75 g·L<sup>-1</sup> konzentriert hat (siehe Abbildung 4.4-5). Eine solch eindeutige Aussage konnte für AMPA nicht gemacht werden. Tendenziell scheint aber eher die Acidogenese gehemmt zu sein, da hier deutliche Unterschiede zum Blank erkennbar sind. Außerdem zeigt sich, dass Glyphosat in geringeren Konzentrationen durch die enzymatische Hydrolyse abgebaut wird und den anaeroben Biogasprozess nicht stört, was in diesem Fall zu einer anfänglichen Hemmung führt, die im Laufe des Versuches nicht mehr auftritt. Auf Grundlage der Ergebnisse scheint ein Einfluss von Glyphosat und AMPA auf z.B. eine landwirtschaftliche Biogasanlage nicht zu befürchten. Zwar gibt es vereinzelte Befunde mit hohen Rückständen von Glyphosat in Futtermitteln von Rindern (0,4-0,9 mg·kg<sup>-1</sup>, entspricht ca. 2-5 mM) [8], aber auch diese liegen noch unterhalb der hier gemessenen hemmenden Konzentrationen (siehe Abbildung 4.4-4). Eine Gefährdung geht daher



bei einer vorschriftsmäßigen Handhabung von Glyphosat für die Biogaserzeugung nicht aus. Dabei sollte gemäß den Vorschriften Glyphosat nicht als Ernte-Hilfsstoff eingesetzt werden und beim Vorernteeinsatz der Zeitraum zwischen Aufbringung und Ernte möglichst groß gewählt sein.



**Abbildung 4.4-6 AMPA:** Gemittelte kumulative Messung der Biogasproduktionsrate (n=2) in Gegenwart von AMPA im Konzentrationsbereich von 20 bis 60 mmol·L<sup>-1</sup>



**Abbildung 4.4-7 AMPA Fettsäureprofil:** Konzentrationssauftragung der flüchtigen organischen Säuren vermessen mittels Ionen Chromatographie (n=2)

#### 4.5 Ergebnisse zum Einfluss von quaternäre Ammoniumverbindungen auf die Biogaserzeugung

Wie in Kapitel 2.2 einleitend erwähnt, haben quaternäre Ammoniumverbindungen eine hohe wirtschaftliche Bedeutung und werden in vielen Handelsprodukten eingesetzt [47]. Im Veterinärbereich werden sie vor allem als Desinfektionsmittel verwendet z.B. bei der Reinigung von Schweineställen, von Stallwerkzeugen, Futtersilos, Melkzeugnissen o.ä. [49, 50]. Angefallenes Spülwasser kann hierbei zusammen mit der Gülle entsorgt werden [56]. Dabei ist sowohl das gemeinsame Ausbringen von Gülle und Spülwasser als Dünger zulässig als auch das Einleiten des Spülwasser in die Biogasanlage [56]. Die Belastung von Biogasanlagen hat das österreichische Umweltbundesamt und das Umweltinstitut Wien 2007 in einer ersten umfangreichen Studie veröffentlicht. In dieser Studie wurden sechs Biogasanlagen im Landkreis Vorarlberg untersucht. Hierbei wurden QACs (z.B. DDMA-C10 bis DDMA-C18, BDMA-C12 bis BDMA-C18, ATAC-C12 bis ATAC-C16) in teilweise nicht unerheblichen Mengen (bis  $119 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  bzw.  $0,35 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) nachgewiesen. Im Mittel lagen die Konzentrationen der detektierten QACs zwischen  $0,041$  und  $2,2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  ( $1,2577 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  und  $0,006 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Die höchsten Werte wurden für die Benzyl-Alkyl-Ammoniumverbindungen nachgewiesen, die teilweise im ökotoxikologischen relevanten Bereich lagen [65]. Diese Studie war Anlass, die Wirkung ausgewählter QACs auf das anaerobe Milieu einer Mischkultur aus einer betrieblichen Biogasanlage der Firma Uniform zu testen. Nachfolgend werden diese Ergebnisse beschrieben und diskutiert. Dabei wurden zuerst Vorversuche durchgeführt, um den Konzentrationsbereich zu ermitteln, in dem mit einem mikrobiologischen Effekt zu rechnen ist. Anschließend wurden innerhalb diesen Bereichs für die einzelnen Substanzen sowohl die Effekte auf die Biogasratenbildung als auch der Einfluss auf das Fettsäureprofile untersucht. Neben der Testung der einzelnen Substanzen wurde getestet, ob die Kombination von mehreren QACs (BDMA-C12/BDMA-C16, ATMA-C12/ATMA-C16 und BDMA-C16/BDMA-C16/DDMA-C10) einen synergistischen Effekt hat. Dies ist zum einen von besonderer Bedeutung, da ein solcher Test bezogen auf eine anaerobe Mischkultur noch nicht durchgeführt wurde. Zum anderen enthalten, wie in 2.2 erwähnt, die Präparate auf dem Markt mehrere Komponenten. Gerade die Ergebnisse vom österreichischen Umweltbundesamt zeigen, dass in Biogasanlagen nicht nur von einer Belastung ausgegangen werden kann [65], was die Testung auf einen synergistischen oder synergistischen Effekt besonders interessant macht. Der Beschreibung der Versuchsdurchführung in Kapitel 3.1 schließt sich die FOS-Analyse (Kapitel 3.3) an.

#### 4.5.1 Vorversuche zur Ermittlung der Wirkkonzentration von quaternären Ammonium-Verbindungen auf Mikroorganismenkulturen im anaerobe Milieu

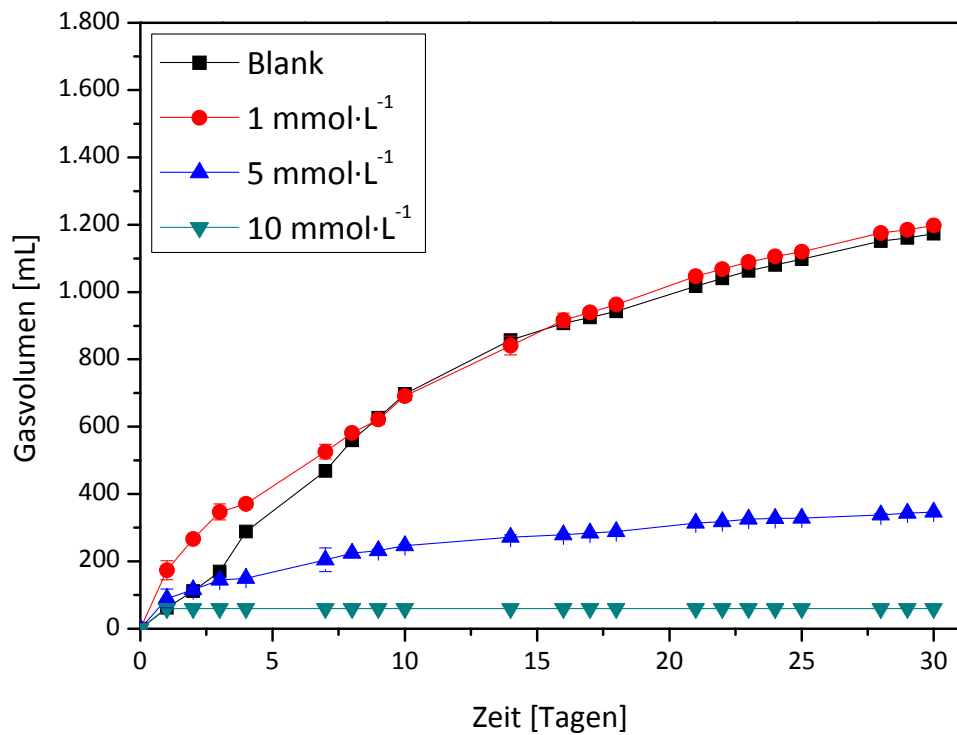
Analog zu der Versuchsreihe mit Glyphosat wurden auch bei den QACs mehrere Vorversuche durchgeführt, bei denen innerhalb kurzer Versuchszeiten (5 bis 10 Tage) der Konzentrationsbereich ermittelt werden sollte, in dem ein Effekt auf Biomasse im anaeroben Milieu zu erkennen ist. Für die Vorversuche wurde nicht jede einzelne Verbindung der zu testenden QACs überprüft, sondern exemplarisch ATMA-C16, BDMA-C12 und DDMA-C10. Dabei wurde die Konzentration sukzessiv gesteigert bis ein mikrobiologischer Effekt auftrat. Für ATMA-C12 wurde vermutet, dass ein Effekt auf die verwendete Mischkultur im gleichen Konzentrationsbereich liegt. Für DDMA-C10 wurde ein weiterer Vorversuch durchgeführt, welcher unter 4.5-12 diskutiert wird. Der erste Vorversuch wurde für ATMA-C16 mit den Konzentrationen 5, 20 und 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  durchgeführt. Hier zeigte sich kein Einfluss auf die Biogasproduktion. Nachfolgend wurde für BDMA-C16 der Konzentrationsbereich von 100, 250 und 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  getestet. Auch in diesen Konzentrationsbereichen wurde kein Einfluss auf die Biogasproduktion gemessen. Das gemittelte kumulierte Gasvolumen lag zwischen 8 und 14 % unterhalb der des Blanks, was bei der Einbeziehung der Max/Mix-Werte einer nicht signifikanter Abweichung entspricht. Der dritte Vorversuch wurde für BDMA-C12 im Konzentrationsbereich von 1 bis 10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  durchgeführt. Hierbei trat ein erheblicher Einfluss auf die Biogasproduktion bei den Konzentrationen von 5 und 10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  auf. Die gemittelten kumulativen Biogasvolumina lagen nach sieben Tagen 58 % und 86 % unterhalb der des Blanks. Im letzten Vorversuch wurde DDMA-C10 getestet. Der getestete Konzentrationsbereich wurde bei dieser Verbindung zwischen 0,1 und 1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  gewählt, da eine höhere mikrobiologische Aktivität vermutet wurde. Dies konnte für diesen Konzentrationsbereich ausgeschlossen werden, da kein hemmender Einfluss auf die Biogasproduktion verzeichnet wurde. Das gemittelte kumulierte Gasvolumen lag zwischen 89 und 150 % bezogen auf das gemittelte Gasvolumen der Blanks. Für die nächsten Versuchsreihen wurde somit der Konzentrationsbereich von 1 bis 10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  festgelegt.

#### 4.5.2 Einfluss von Benzylododecyldimethylammoniumchlorid auf die Biogaserzeugung im Konzentrationsbereich von 1 bis 10 mmol·L<sup>-1</sup>

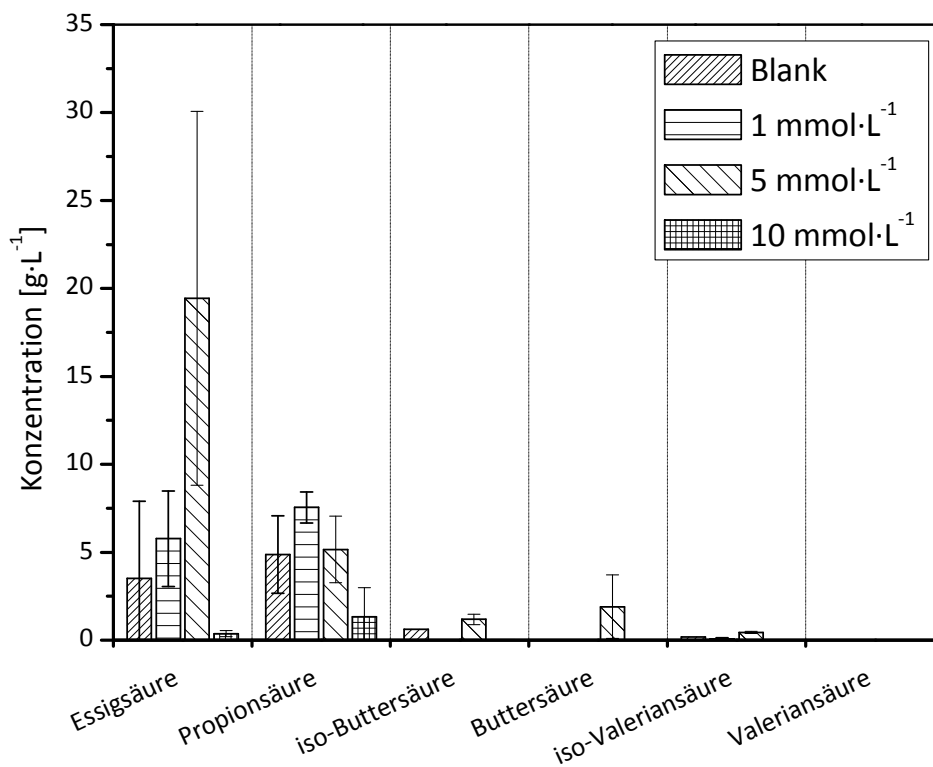
Die Messergebnisse von BDMA-C12 sind in Abbildung 4.5-1 aufgeführt. Bei der Konzentration von 1 mmol·L<sup>-1</sup> ist kein negativer Einfluss auf die Biogasproduktion zu erkennen. Die gemittelte kumulative Gasmenge unterscheidet sich nur um 2 % zu der des Blanks. Zu erkennen ist allerdings, dass sich die Lag-Phase bei 1 mmol·L<sup>-1</sup> anders verhält als beim Blank. Dies wird abschließend in der Diskussion unter Kapitel 4.5.12 noch einmal aufgegriffen. Für die Konzentrationen von 5 und 10 mmol·L<sup>-1</sup> liegen die gemittelten kumulativen Gasmengen nur bei 30 % und 5 % im Vergleich zu der des Blanks. Dies entspricht einem signifikanten Unterschied. Darüber hinaus weisen auch die K<sub>R</sub>-Werte dieser beiden Proben einen signifikanten Unterschied zu den Blanks und der bei 1 mmol·L<sup>-1</sup> gemessenen Gasrate auf. Die beiden nicht inhibierten Proben haben einen K<sub>R</sub>-Wert von 19 d und 18 d, wohingegen die beiden KR-Werte der inhibierten Proben 108 d und 649 d betragen. Daher kann hier von einer Hemmung der Bioprozesse des anaeroben Milieus gesprochen werden. Bei der Auswertung der Fettsäureprofile fällt außerdem auf, dass im Blank und in der Probe mit 1 mmol·L<sup>-1</sup> noch Essigsäure und Propionsäure vorhanden sind, die länger-kettigen Fettsäuren hingegen nicht. Dies lässt auf einen noch nicht vollständigen anaeroben Abbau der Cellulose schließen. Dies ist auch anhand der Biogasratenbildung zu erkennen, da die stationäre-Phase noch nicht erreicht wurde. Eine Hemmung ist für diese beiden Proben daher auszuschließen. Bei der Probe mit 5 mmol·L<sup>-1</sup> ist die Konzentration an Essigsäure mit 5 g·L<sup>-1</sup> nicht sehr hoch. Es sind auch die länger-kettigen Fettsäuren in der Probe enthalten. Dies und die deutlich verminderte Biogaserzeugung sind eindeutige Hinweise auf eine Hemmung bestimmter Bioprozesse des anaeroben Milieus. Es ist anzunehmen, dass vorwiegend die Archaeen gehemmt werden, da die vorhandene Essigsäure nur unzureichend zu Methan und Kohlenstoffdioxid umgesetzt wurde. In den Proben mit 10 mmol·L<sup>-1</sup> ist quasi kein Biogas entstanden. Eine mikrobiologische Aktivität ist nur am ersten Tag zu erkennen, da anschließend sofort die stationäre Phase eintritt. Da bei der Analyse des Fettsäureprofils keine oder nur sehr geringe Mengen an flüchtigen organischen Säuren gemessen wurden, ist davon auszugehen, dass nicht nur die Archaeen, sondern auch die Acetogene und die Acidogene und eventuell sogar die Hydrolyse gehemmt wurden. Ein möglicher Grund hierfür könnte eine Zelllyse sein. Somit läge keine Hemmung, sondern eine Abtötung der Mikroorganismen vor.

**Tabelle 4.5-1 QACs:** Ergebnisse der Testserie zu BDMA-C12

Probe	Relative Gasvolumen	K <sub>R</sub> -Wert [d]
Blank	100 %	19
1 mmol·L <sup>-1</sup>	102 %	18
5 mmol·L <sup>-1</sup>	30 %	108
10 mmol·L <sup>-1</sup>	2 %	649



**Abbildung 4.5-1 BDMA-C12:** Gemittelte kumulative Messung (n=2) der Biogasproduktionsrate in Gegenwart von BDMA-C12 im Konzentrationsbereich von 1 bis 10 mmol·L<sup>-1</sup>



**Abbildung 4.5-2 BDMA-C12 Fettsäureprofil:** Konzentrationsauftragung der flüchtigen organischen Säuren vermessen mittels Ionen Chromatographie (n=2)

#### 4.5.3 Einfluss von Benzylhexadecyldimethylammoniumchlorid auf die Biogaserzeugung im Konzentrationsbereich von 1 bis 10 mmol·L<sup>-1</sup>

In Abbildung 4.5-3 sind die gemittelten Messergebnisse aus der Versuchsreihe mit BDMA-C16 aufgetragen. Im Gegensatz zu BDMA-C12 hat BDMA-C16 bereits bei 1 mmol·L<sup>-1</sup> einen signifikanten Einfluss auf die Biogasproduktion. Das kumulierte Gasvolumen beträgt nur 48 % im Vergleich zu dem des Blanks. Zu erkennen ist analog zu BDMA-C12, dass die Lag-Phase eine höhere Steigung im Vergleich zum Blank hat. Dies wird in der Diskussion unter 4.5.12 aufgegriffen. Der Stoffwechselzustand der Proben mit der Konzentration von 5 mmol·L<sup>-1</sup> und 10 mmol·L<sup>-1</sup> befindet sich bei beiden bereits sehr früh in der stationären Phase, was analog zu BDMA-C12 auf eine Lysis schließen lassen könnte. Die Proben mit 1 mmol·L<sup>-1</sup>, 5 mmol·L<sup>-1</sup> und 10 mmol·L<sup>-1</sup> weichen im K<sub>R</sub>-Wert stark vom Blank ab. Betrachtet man das Fettsäureprofil fällt auf, dass die Probe mit 5 mmol·L<sup>-1</sup> im Verhältnis zu den anderen Proben dieser Testreihe eine hohe Konzentration an Essigsäure besitzt. In diesem Fall scheinen vor allem die Archaeen betroffen zu sein, anders als bei der Probe mit 10 mmol·L<sup>-1</sup>, da hier die länger-kettigen Fettsäuren nicht hoch konzentriert sind. Eine Hemmung oder Lysis, die nur die Archaeen betrifft, müsste zu einer erhöhten Konzentration von Essigsäure führen. Außerdem ist die gemessene Konzentration der FOS sogar geringer als beim Blank, was zwangsläufig auf einen Einfluss auf die Acidogenese zurückzuführen ist.

**Tabelle 4.5-2 QACs:** Ergebnisse der Testserie zu BDMA-C16

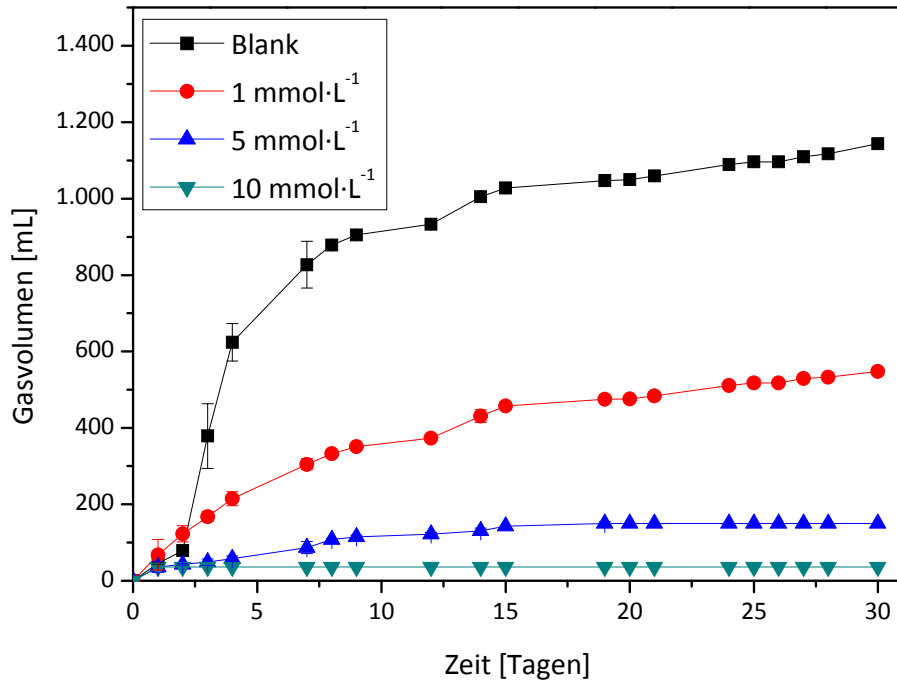
Probe	Relative Gasvolumen	K <sub>R</sub> -Wert [d]
Blank	100 %	6
1 mmol·L <sup>-1</sup>	48 %	37
5 mmol·L <sup>-1</sup>	12 %	183
10 mmol·L <sup>-1</sup>	3 %	789

#### 4.5.4 Vergleich des Einflusses von BDMA-C12 zu BDMA-C16 auf die Biogaserzeugung im gleichen Konzentrationsbereich

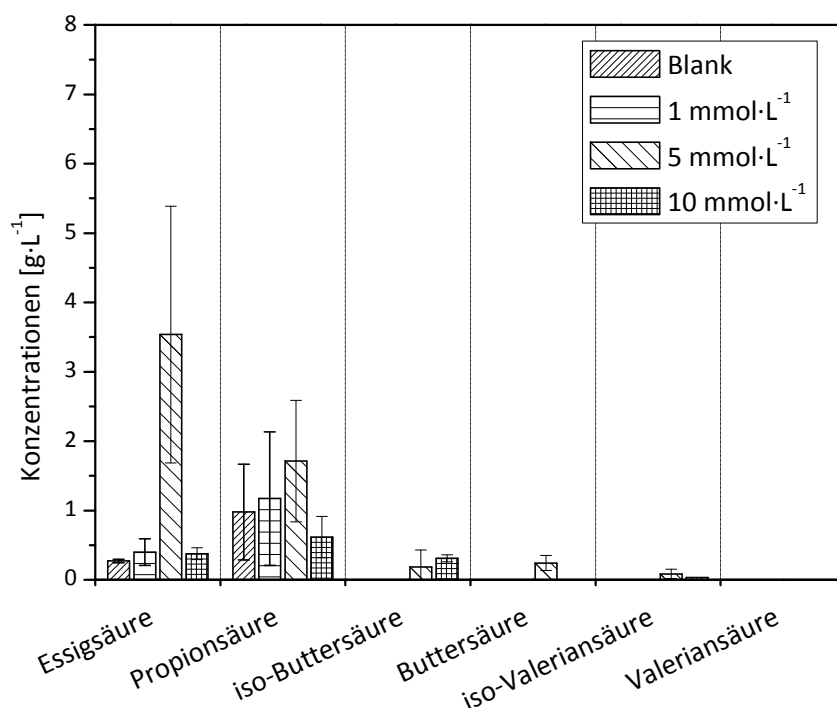
Innerhalb der benzylierten QACs ist ein Vergleich der beiden Stoffe BDMA-C12 und BDMA-C16 von besonderer Bedeutung, da hier strukturspezifische Zusammenhänge heran gezogen werden können. Tezel et al. haben in ihrer Studie von 2006 gezeigt, dass die Toxizität gegenüber anaeroben Mischkulturen mit der Länge der Seitenkette zunimmt [131]. Dies ist aus den

Ergebnissen ebenfalls so abzuleiten. Des Weiteren geht Tezel davon aus, dass primär die Archaeen gehemmt sind bzw. einer Lysis unterliegen. Basierend auf den Fettsäureprofilen und der Biogasentwicklung kann auch diese Annahme in beiden vorliegenden Fällen bestätigt werden. Grund für eine höhere Empfindlichkeit der Archaeen ist, dass die Membran im Vergleich von Archaeen

große Unterschiede aufweist. Dies wird in der abschließenden Diskussion in Kapitel 4.5.12 noch einmal genauer erörtert.



**Abbildung 4.5-3 BDMA-C16:** Gemittelte kumulative Messung (n=2) der Biogasproduktionsrate in Gegenwart von BDMA-C16 im Konzentrationsbereich von 1 bis 10 mmol·L<sup>-1</sup>



**Abbildung 4.5-4 BDMA-C16 Fettsäureprofil:** Konzentrationsauftragung der flüchtigen organischen Säuren vermessen mittels Ionen Chromatographie (n=2)

#### 4.5.5 Einfluss von Dodecyltrimethylammoniumchlorid auf die Biogaserzeugung im Konzentrationsbereich von 1 bis 10 mmol·L<sup>-1</sup>

ATAM-C12 zeigt ähnlich wie BDMA-C12 bei 1 mmol·L<sup>-1</sup> keine Hemmung. Das Biogasvolumen ist nach 30 Tagen mit 22 % sogar etwas höher als beim Blank. Bezieht man die Min/Max-Werte mit ein, so ist der Unterschied nicht signifikant. Ähnlich wie bei BDMA-C12 und BDMA-C16 verläuft auch hier die Lag-Phase bei der Probe mit 1 mmol·L<sup>-1</sup> anders als bei den Blanks. Dies wird in der abschließenden Diskussion zu diesem Kapitel unter 4.5.12 interpretiert. Bei den Proben mit 5 und 10 mmol·L<sup>-1</sup> ist bereits nach einem Tag die stationäre Phase erreicht. Das kumulierte Gasvolumen beträgt nur 10 % bzw. 4 % im Vergleich zum Blank. Die  $K_R$ -Werte weichen erheblich von der des Blanks ab. Dies alles sind Anzeichen für eine Hemmung der biologischen Aktivität der anaeroben Mischkultur. Anhand des Fettsäureprofils von BDMA-C12 und BDMA-C16 konnte gezeigt werden, dass hier vor allem die Archaeen gehemmt waren, da es zu einer Anreicherung mit Essigsäure und Propionsäure gekommen ist. Dies ist hier nicht der Fall. Die höchste Konzentration liegt bei Dodecyltrimethylammonium für Buttersäure mit nur 5 g·L<sup>-1</sup>. Essigsäure, Propionsäure und Isobuttersäure liegen bei beiden Proben bei ca. 0,5 bis 1 g·L<sup>-1</sup>. Die hohe Konzentration an Essigsäure in der Probe kommt zwar davon, dass die Methanogene gehemmt wurden, da Essigsäure nicht zu Methan und Kohlendioxid umgesetzt wurde. Die hohe Konzentration an Buttersäure lässt aber auf eine höhere Hemmung der Acidogenese schließen.

**Tabelle 4.5-3 QACs:** Ergebnisse der Testserie zu ATMA-C12

Probe	Relative Gasvolumen	$K_R$ -Wert [d]
Blank	100 %	21
1 mmol·L <sup>-1</sup>	122 %	17
5 mmol·L <sup>-1</sup>	10 %	373
10 mmol·L <sup>-1</sup>	4 %	933

#### 4.5.6 Einfluss von Hexydecyltrimethylammoniumchlorid auf die Biogaserzeugung im Konzentrationsbereich von 1 bis 10 mmol·L<sup>-1</sup>

Bei ATMA-C16 ist ein signifikanter Einfluss auf die Biogasproduktion bereits bei 1 mmol·L<sup>-1</sup> zu erkennen. Somit scheint bei ATMA-C16 die längere Alkylkette und die damit einhergehende gesteigerte Hydrophobie der Verbindung einen größeren Einfluss auf die Mikroorganismen zu haben. Dies dokumentiert sich sowohl in der kumulativen Biogasrate, welche 57 %, 5 % und 3 % beträgt, als auch bei den  $K_R$ -Werten. Das Fettsäureprofil zeigt, dass im Gegensatz zu ATMA-C12, die Acidogenese nicht stark beeinflusst wird, da bei den Proben mit 5 und 10 mmol·L<sup>-1</sup> ATMA-C16 mit 3,2 g·L<sup>-1</sup> (50 mmol·L<sup>-1</sup>) und 9,5 g·L<sup>-1</sup> (150 mmol·L<sup>-1</sup>) eine hohe Konzentration an Essigsäure vorhanden ist. Die



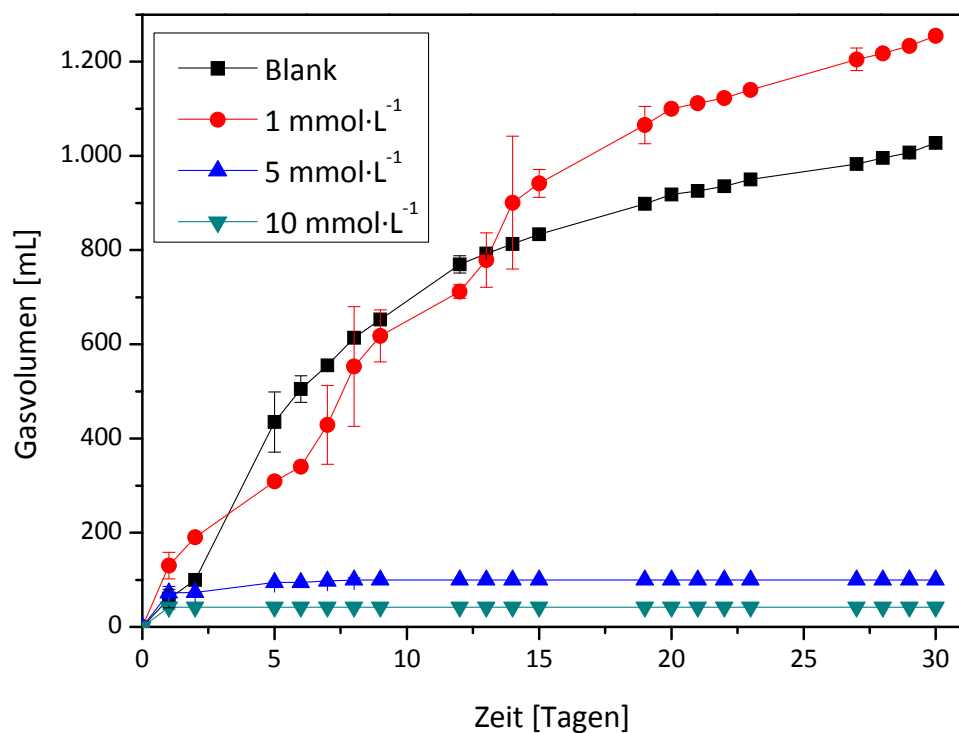
Hemmung der Acetogenese scheint auch bei ATMA-C16 vorzukommen, da eine Konzentration an Essigsäure vorliegt und die vorhandene Isobuttersäure nicht weiter abgebaut wurde.

**Tabelle 4.5-5 QACs:** Ergebnisse der Testserie zu ATMA-C16

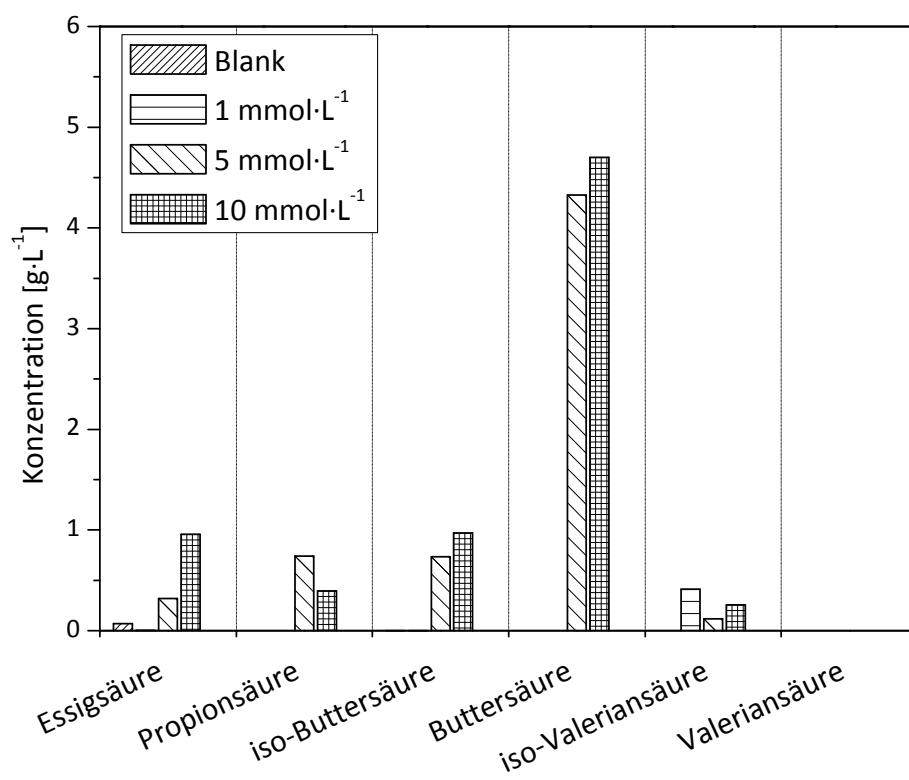
Probe	Relative Gasvolumen	K <sub>R</sub> -Wert [d]
Blank	100 %	11
1 mmol·L <sup>-1</sup>	57 %	37
5 mmol·L <sup>-1</sup>	5 %	538
10 mmol·L <sup>-1</sup>	3 %	1072

#### 4.5.7 Vergleich des Einflusses von ATMA-C12 zu ATMA-C16 und der Vergleich von benzylierten und alkylierten QACs auf die Biogaserzeugung

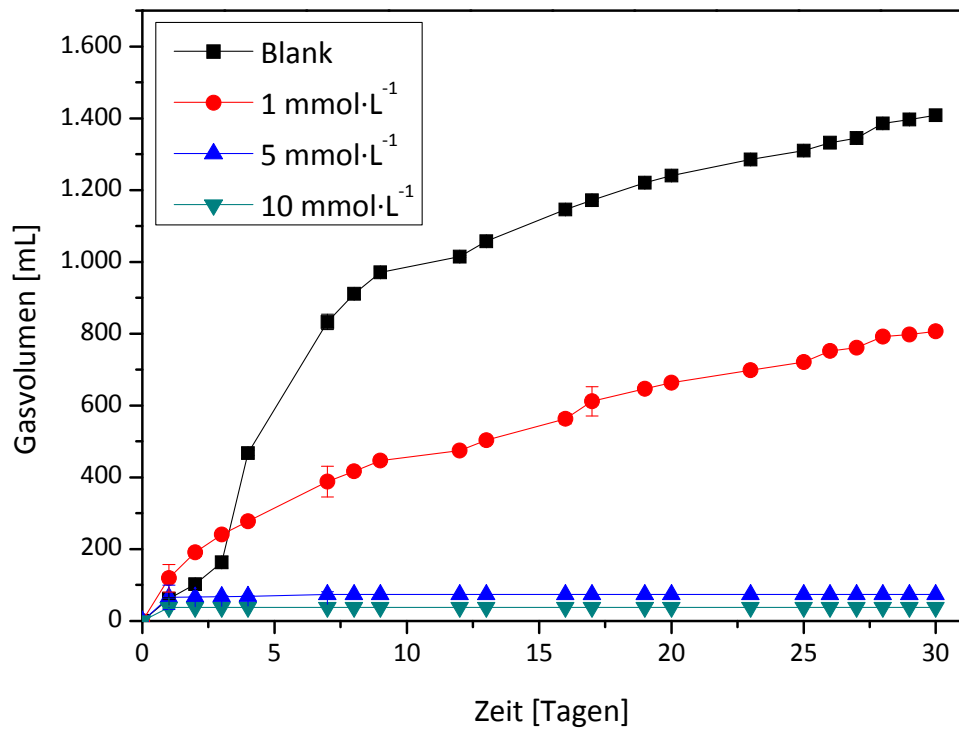
Neben den strukturspezifischen Aussagen, welche man innerhalb der alkylierten und benzylierten QACs treffen kann, ist auch der Unterschied des mikrobiologischen Verhaltens zwischen den beiden Stoffgruppen von Interesse. Wie bereits erwähnt haben Tezel et al. in ihrer Studie von 2006 gezeigt, dass die Toxizität gegenüber anaeroben Mischkulturen mit der Länge der Seitenkette zunimmt [131]. Dies ist sowohl aus den Ergebnissen zu den Versuchen mit BDMA-C12 und BDMA-C16 als auch mit ATMA-C12 und ATMA-C16 abzuleiten. Die Annahme, dass primär die Archaeen gehemmt werden, scheint für BDMA-C12 und BDMA-C16 ebenfalls zu stimmen. Für ATMA-C12 und ATMA-C16 ist offenbar neben der Hemmung der Archaeen auch die Acidogenese gehemmt, was man anhand des Fettsäureprofils herleiten kann. Vergleicht man die einzelnen Stoffe untereinander, ergibt sich folgende relative Reihenfolge der Toxizität: **BDMA-C16>ATMA-C16>ATMA-C12>BDMA-C12**, wobei die Unterschiede bei gleicher Alkylkette sehr gering sind. Die Gewichtung von BDMA-C16 und ATMA-C16 lässt sich mit der höheren Hydrophobie des Moleküls erklären. BDMA-C12 hat eine kritische Mizellenbildungskonzentration (engl. *critical micelle concentration*, CMC) von 0,58 mM gegenüber 1,31 mM bei ATMA [44] und ist somit unpolarer. ATMA-C12 hat im Vergleich dazu und im Vergleich zu BDMA-C12 (3,8 mM) eine hohe CMC von 21,13 mM und ist polarer als die anderen Substanzen. Da ATMA-C12 somit in den getesteten Konzentrationsbereichen noch keine Mizellen bildet und polarer ist als die anderen Substanzen, könnte dies der Grund dafür sein, dass eher die Acidogenese gehemmt wird, da die beteiligten Mikroorganismen eine polarere Zellmembran gegenüber den Archaeen besitzen.



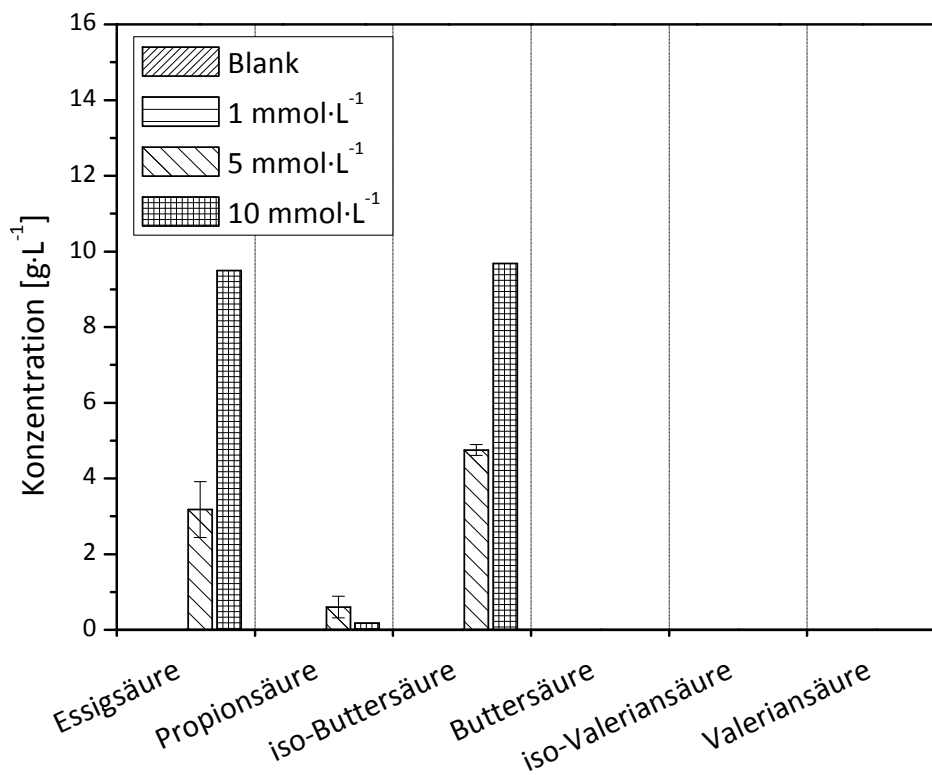
**Abbildung 4.5-5 ATMA-C12:** Gemittelte kumulative Messung (n=2) der Biogasproduktionsrate in Gegenwart von ATMA-C12 im Konzentrationsbereich von 1 bis 10 mmol·L<sup>-1</sup>



**Abbildung 4.5-6 ATMA-C12 Fettsäureprofil:** Konzentrationsauftragung der flüchtigen organischen Säuren vermessen mittels Ionen Chromatographie (n=2)



**Abbildung 4.5-7 ATMA-C16:** Gemittelte kumulative Messung (n=2) der Biogasproduktionsrate in Gegenwart von ATMA-C16 im Konzentrationsbereich von 1 bis 10 mmol·L<sup>-1</sup>



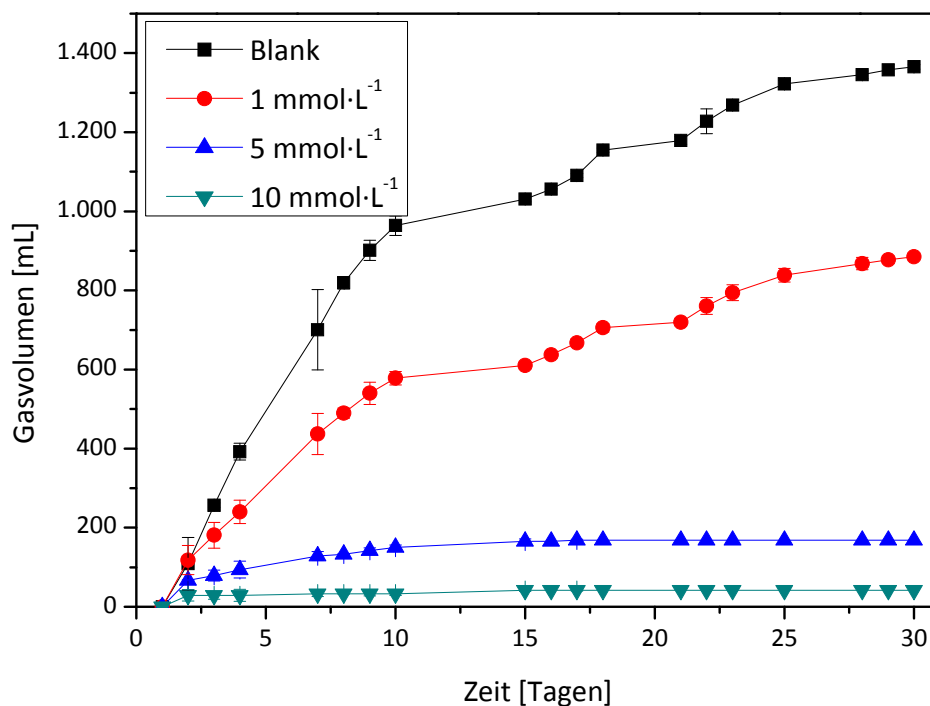
**Abbildung 4.5-8 ATMA-C16 Fettsäureprofil:** Konzentrationsauftragung der flüchtigen organischen Säuren vermessen mittels Ionen Chromatographie (n=2)

#### 4.5.8 Einfluss von Didecyldimethylammoniumbromid auf die Biogasproduktion im Konzentrationsbereich von 1 bis 10 mmol·L<sup>-1</sup>

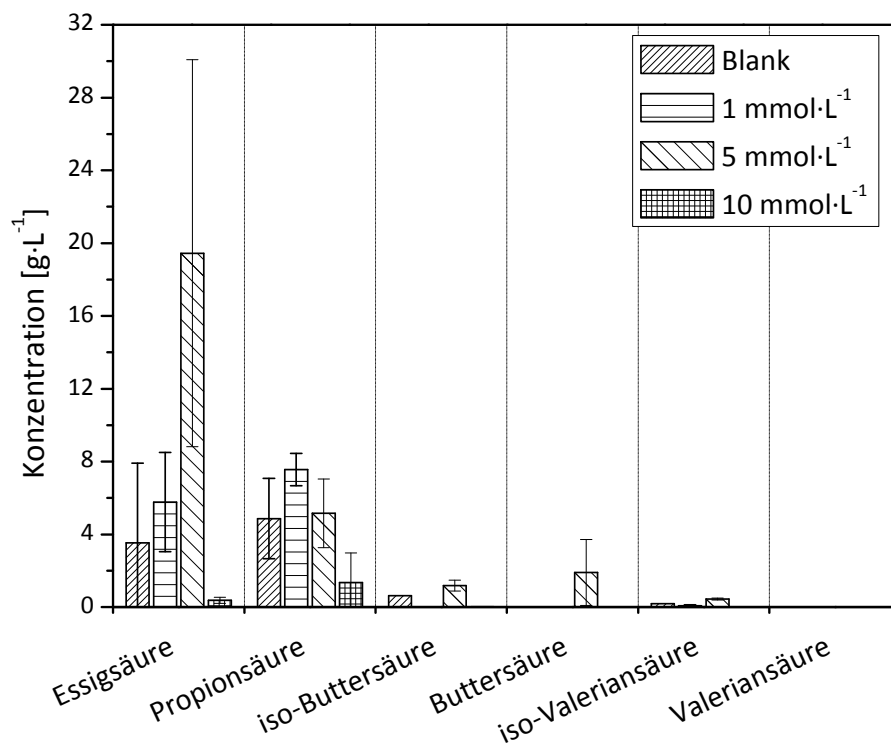
DDMA-C10 zeigt ähnlich wie BDMA-C16 und ATMA-C16 bereits bei 1 mmol·L<sup>-1</sup> eine Hemmung der Biogasrate. Die zwei Alkylketten besitzen ebenfalls eine höhere Hydrophobie und scheinen analog zu BDMA-C16 und ATMA-C16 einen größeren Einfluss auf die Mikroorganismen zu haben. Dies zeigt sich sowohl in der kumulativen Biogasrate, welche 64 %, 12 % und 3 % beträgt als auch bei den K<sub>R</sub>-Werten. Anhand des Fettsäureprofils lässt sich schließen, dass die Acidogenese und Acetogenese nicht stark beeinflusst waren, da bei den Proben mit 1 und 5 mmol·L<sup>-1</sup> eine hohe Konzentration von Essigsäure vorhanden ist. Bei der Konzentration von 10 mmol·L<sup>-1</sup> scheint es zu einem vollständigen Erliegen der biologischen Aktivität gekommen zu sein, da keine FOSs gebildet wurden.

**Tabelle 4.5-5 QACs:** Ergebnisse der Testserie zu DDMA-C10

Probe	Relative Gasvolumen	K <sub>R</sub> -Wert [d]
Blank	100 %	13
1 mmol·L <sup>-1</sup>	64 %	31
5 mmol·L <sup>-1</sup>	12 %	229
10 mmol·L <sup>-1</sup>	3 %	971



**Abbildung 4.5-9 DDMA-C10:** Gemittelte kumulative Messung (n=2) der Biogasproduktionsrate in Gegenwart von DDMA-C10 Konzentrationsbereich von 1 bis 10 mmol·L<sup>-1</sup>



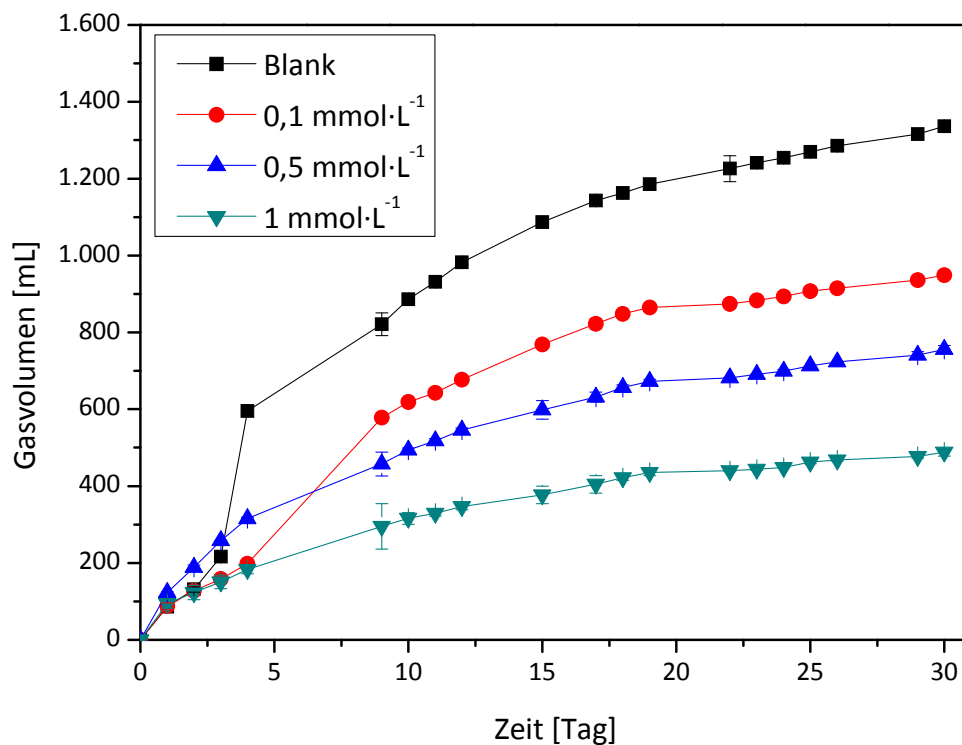
**Abbildung 4.5-10 DDMA-C10 Fettsäureprofil:** Konzentrationsauftragung der flüchtigen organischen Säuren vermessen mittels Ionen Chromatographie (n=2)

#### 4.5.9 Testung der Mischung von BDMA-C12 und BDMA-C16 auf einen synergistischen Effekt

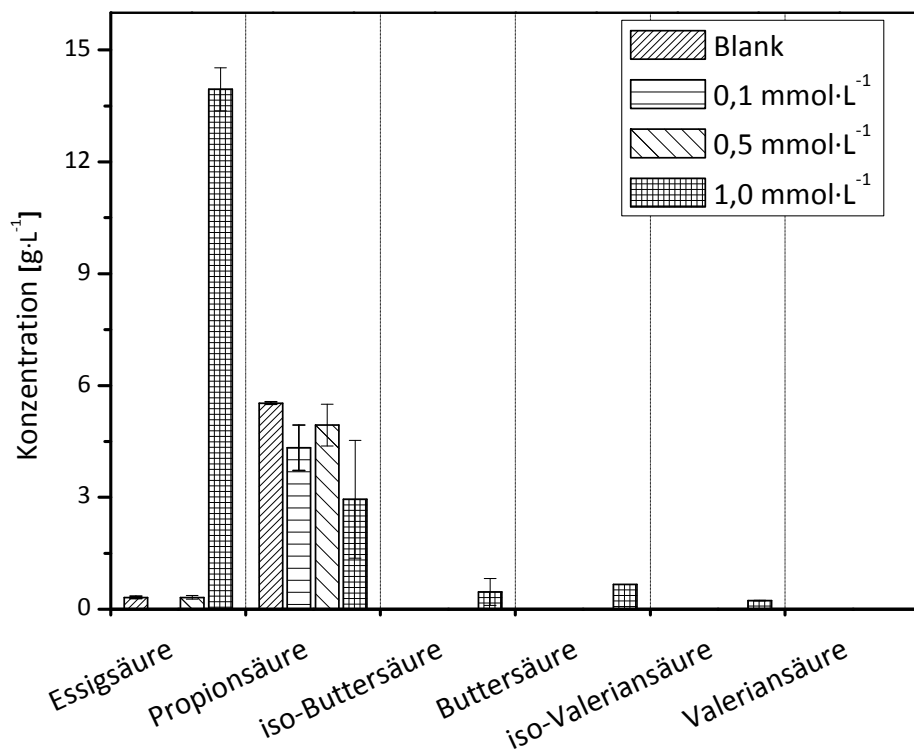
Wie einleitend bereits beschrieben ist neben des mikrobiologischen Effektes der einzelnen Substanzen besonders interessant, ob die Mischungen bei gleicher gesamt Konzentration einen stärkeren Einfluss auf die anaerobe Mischkultur haben und somit einen synergistischen Effekt aufweisen. Hierzu wurden die beiden Substanzen mit gleicher Konzentration im Mix getestet. In der ersten Versuchsreihe wurde der gleiche Konzentrationsbereich wie bei den einzelnen Verbindungen getestet ( $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  und  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Hierbei zeigte sich bereits bei  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  eine deutliche Hemmung, woraufhin der Versuch in einem geringeren Konzentrationsbereich erneut durchgeführt wurde. Getestet wurden die Konzentrationen von  $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  und  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Bei allen drei Konzentrationen liegen die Biogasvolumina unter der des Blanks (29 %, 43 % und 63 %, siehe auch Abbildung 4.5-9). Somit zeigt sich, dass die benzylierte QACs in Kombination miteinander einen stärkeren Effekt (Faktor 100) auf die anaerobe Mischkultur haben als die Einzelsubstanzen. Betrachtet man das Fettsäureprofil, (Abbildung 4.5-12) scheint analog zu den einzelnen Versuchen nur die Methanogenese gehemmt zu sein. Die Anreicherung mit Propionsäure, die auf eine Hemmung der Acetogenese deuten würde, ist nicht auf die QACs zurückzuführen, da auch beim Blank eine Anreicherung stattgefunden hat.

#### 4.5.10 Testung der Mischung von ATMA-C12 und ATMA-C16 auf einen synergistischen Effekt

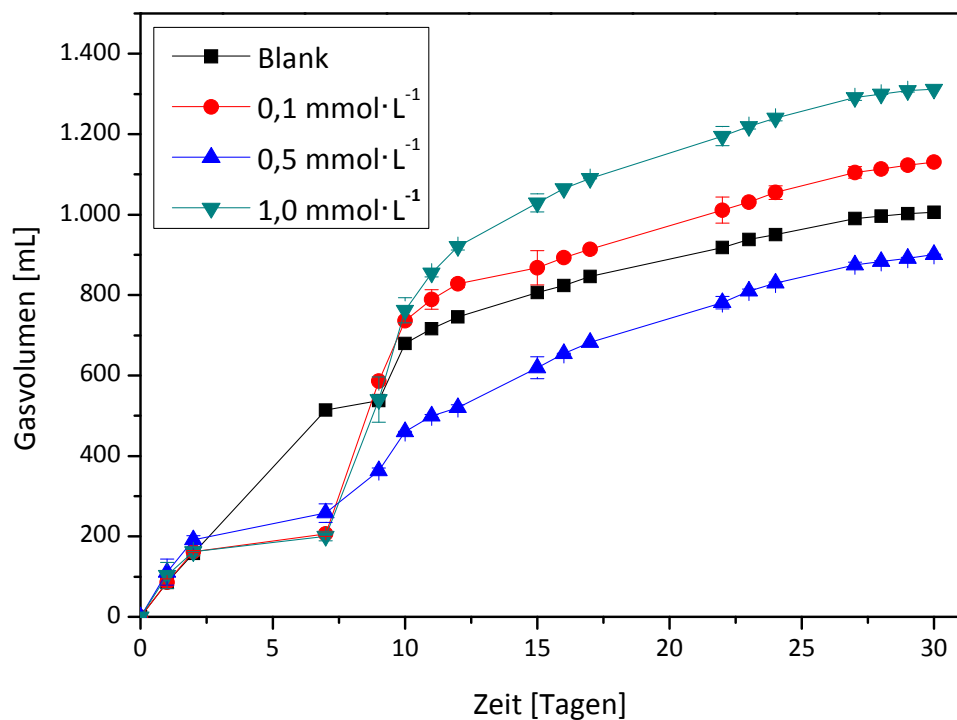
Analog zu den Versuchen in Kapitel 4.5.8 wurden die beiden alkylierten Verbindungen ATMA-C12 und ATMA-C16 ebenfalls in der Kombination miteinander getestet. Hierzu wurde der gleiche Konzentrationsbereich von  $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  bis  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  wie bei BDMA-C12 und BDMA-C16 untersucht. Wie in Abbildung 4.5-12 zu sehen, liegt in diesem Konzentrationsbereich keine Hemmung vor. Die Proben mit  $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  und  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  liegen um 12 % und 30 % oberhalb des Blanks, bei der Probe mit  $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  wurde 11 % weniger Gas produziert. Das primäre Ziel des Versuchs war es, nachzuweisen ob ATMA-C12 und ATMA-C16 einen synergistischen Effekt haben. Dies kann hiermit ausgeschlossen werden. Die Kombination aus diesen beiden Substanzen hat in diesem Konzentrationsbereich keinen hemmenden Effekt. Eine Erhöhung der Konzentration wäre hier kein Nachweis auf einen synergistischen Effekt, da die Gaskonzentration im gleichen Konzentrationsbereich wie bei den ersten Einzelsubstanzen lägen.



**Abbildung 4.5-11 BDMA-C12 und BDMA-C16 Mix:** Gemittelte kumulative Messung ( $n=2$ ) der Biogasproduktionsrate in Gegenwart von BDMA-C12 und BDMA-C16 Mix im Konzentrationsbereich von  $0,1$  bis  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$



**Abbildung 4.5-12 BDMA-C12 und BDMA-C16 Fettsäureprofil:** Konzentrationssauftragung der flüchtigen organischen Säuren vermessen mittels Ionen Chromatographie (n=2)



**Abbildung 4.5-13 ATMA-C12 und ATMA-C16 Mix:** Gemittelte kumulative Messung der Biogasproduktionsrate in Gegenwart von ATMA-C12 und ATMA-C16 Mix im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 1 mmol·L<sup>-1</sup>. Abweichend zu den vorherigen Test wurde bei dem Blank nur eine Probe vermessen, da im Laufe der Versuchsreihe beim zweiten Blank eine Undichtigkeit auftrat.

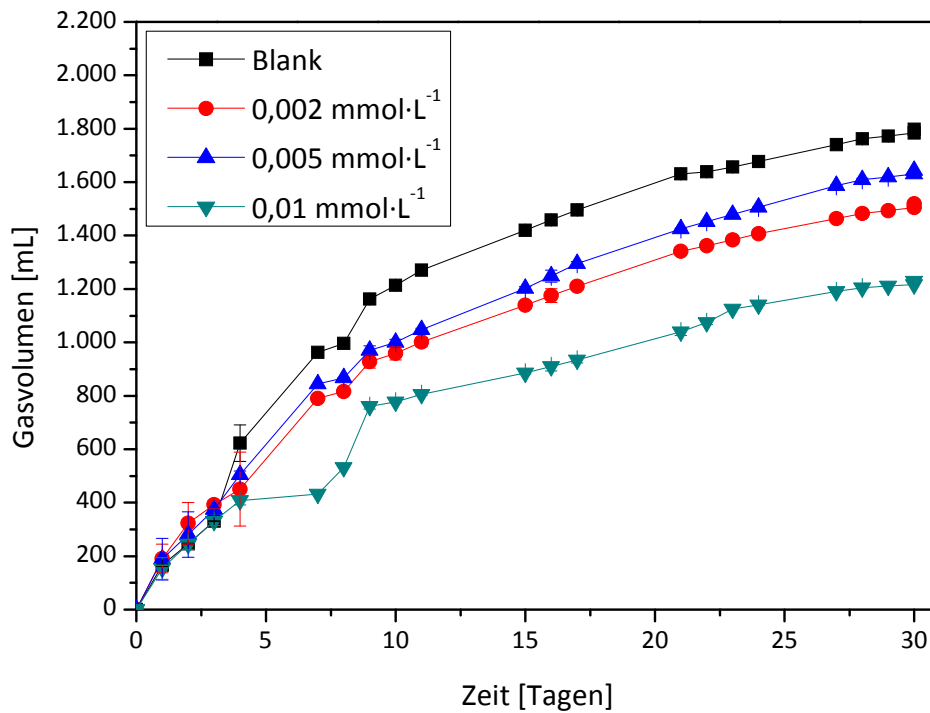
#### 4.5.11 Testung der Mischung von BDMA-C12, BDMA-C16 und DDMA-C10 auf einen synergistischen Effekt

Da in Handelsprodukten nicht nur die Kombination von BDMA-C12 und BDMA-C16 verwendet wird, sondern auch der dreifach Mischung BDMA-C12, BDMA-C16 und DDMA-C10 wurde auch diese Kombination auf einen möglichen synergistischen Effekt getestet. Hierzu wurden die drei Substanzen mit gleicher gesamt Konzentration im Mix getestet. Der verwendete Konzentrationsbereich lag, basierend auf den Kombinationsversuchen von BDMA-C12/C16 und ATMA-C12/16, zunächst bei  $0,1\text{-}1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Hierbei zeigte sich bereits bei  $0,1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  eine deutliche Hemmung, woraufhin der Versuch abgebrochen wurde und mit einem geringeren Konzentrationsbereich erneut analysiert wurde. Dabei wurden die Konzentrationen von  $0,002$ ,  $0,005$  und  $0,01\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  getestet. In Abbildung 4.5-13 ist das Biogasvolumen aufgetragen. Bei allen drei Konzentrationen liegt das erzeugte Gasvolumen mit 84 %, 91 % und 68 % unterhalb der des Blanks. Im Konzentrationsbereich von  $0,01\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  scheint es zu einer leichten Hemmung zu kommen. Betrachtet man das Fettsäureprofil (Abbildung 4.5-15) und die  $K_R$ -Werte (Tabelle 4.5-5), scheint in allen Konzentrationsbereichen keine ausgeprägte Hemmung stattzufinden. Nichtsdestotrotz kann festgestellt werden, dass die QACs in dieser Kombination miteinander einen stärkeren Effekt auf die anaerobe Mischkultur haben als die Einzelsubstanzen und als die Kombination aus BDMA-12 und BDMA-C16. Die getestete Konzentration liegt um den Faktor 100 niedriger als bei Einzelsubstanzen und um einen Faktor von 10 niedriger als bei BDMA-C12/BDMA-C16 und haben somit einen synergistischen Effekt. Der Grund hierfür wird in der abschließenden Diskussion noch einmal aufgegriffen.

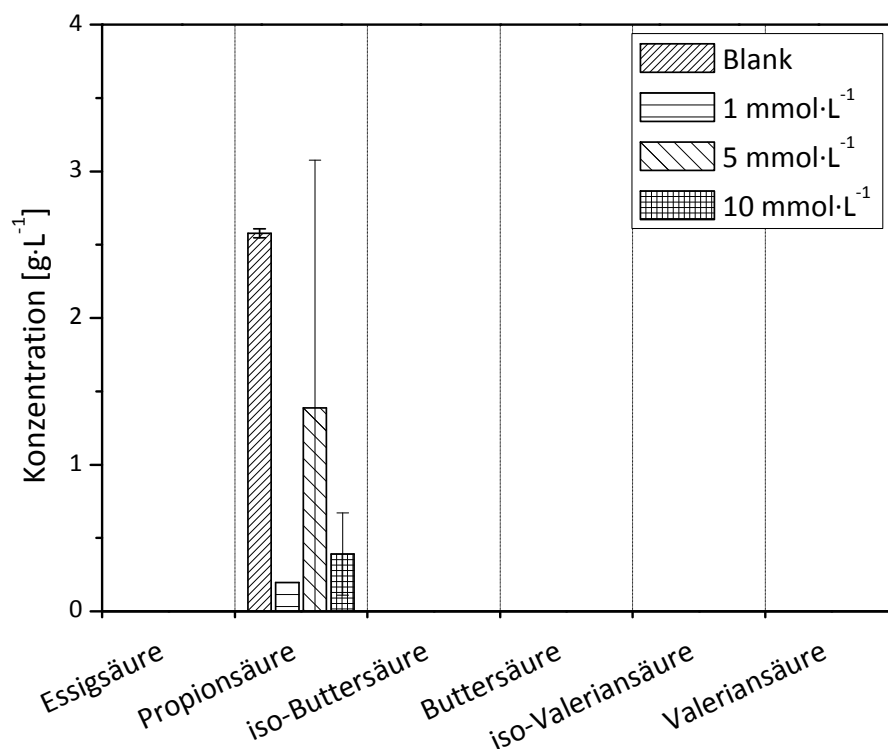
**Tabelle 4.5-5 QACs:** Ergebnisse der Testserie zu BDMA-C12, BDMA-C16 und DDMA-C10

Probe	Relative Gasvolumen	$K_R$ -Wert [d]
Blank	100 %	10
$0,002\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	84 %	16
$0,005\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	91 %	14
$0,01\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	68 %	26





**Abbildung 4.5-14 BDMA-C12, BDMA-C16 und DDMA-C10:** Gemittelte kumulative Messung (n=2) der Biogasproduktionsrate in Gegenwart von BDMA-C12, BDMA-C16 und DDMA-C10 Konzentrationsbereich von 0,02 bis 0,01 mmol·L<sup>-1</sup>

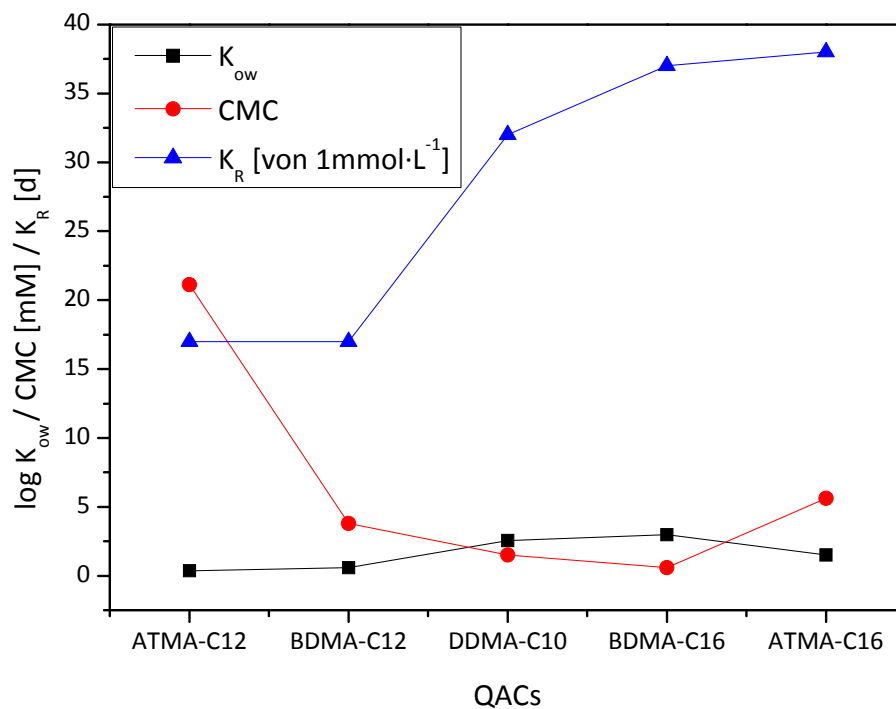


**Abbildung 4.5-15 BDMA-C12, BDMA-C16 und DDMA-C10 Fettsäureprofil:** Konzentrationsauftragung der flüchtigen organischen Säuren vermessen mittels Ionen Chromatographie (n=2)

#### 4.5.12 Zusammenfassung der Wirkung von QACs auf die anaerobe Mischkulturen zur Biogaserzeugung

Mit Hilfe von Eudiometeruntersuchungen wurde sowohl der Effekt von einzelnen QACs als auch Mischungen dieser auf eine anaerobe betrieblicher Mischkultur der Firma Uniform getestet. Dabei stand der Einfluss auf die Biogasproduktion im Mittelpunkt dieser Untersuchungen. Es konnte gezeigt werden, dass alle getesteten QACs ab einen Konzentrationsbereich von 1 bis 5 mmol·L<sup>-1</sup> die Biogasproduktion erheblich vermindern. Das kann relevant für Anwender sein, welche hohe Mengen an Desinfektionsmittel in Stallanlagen verwenden und das Abwasser anschließend zusammen mit der Gülle über einen anaeroben Prozess entsorgen. Konzentrationen in dieser Größenordnung sind bereits in Biogasanlagen vorgekommen und dokumentiert [58, 59, 66, 133].

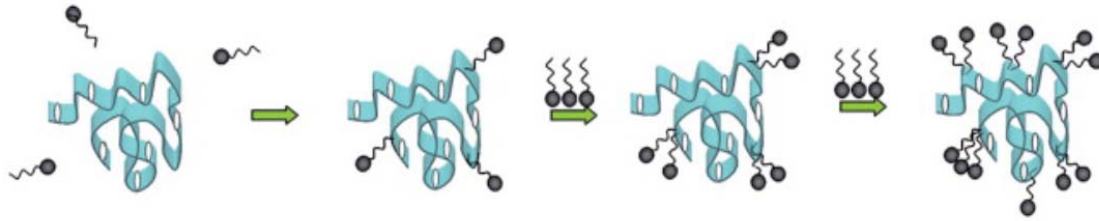
Die induzierte Lysis, welche als Ursache für den mikrobiologischen Effekt verantwortlich ist [133], steigt dabei mit zunehmender Hydrophobie innerhalb der Stoffklassen BDMA und ATMA aber auch zwischen den beiden Stoffklassen. Die in Abbildung 4.5-16 aufgetragenen  $K_{ow}$ -Wert, kritische Mizellen-Konzentration (engl. *critical micelle concentration*, CMC) und  $K_R$ -Wert der jeweiligen Substanzen im Konzentrationsbereich von 1 mmol·L<sup>-1</sup> lassen deutlich erkennen, dass mit zunehmender Unpolarität (steigender log  $K_{ow}$ -Wert, sinkender CMC-Wert) die mikrobiologische Aktivität der QACs zunimmt (steigender  $K_R$ -Wert). Dies deckt sich mit der Annahme, dass der Wirkmechanismus der QACs eine Zelllysis oder Störung der zellulären Osmolarität durch Interaktion an der unpolaren Zellwand verursacht [52, 134]. Dass dadurch vor allem auf Grund der Zellwandeigenschaften die Archaeen betroffen sind, wird auch durch die Analyse der Fettsäureprofile deutlich und steht im Einklang mit Tezel et al. [131]. Die Hypothese, dass es sich bei dem hier vorhandenen Wirkmechanismus um eine Intoxikation handelt und nicht um eine klassische enzymatische kompetitive, nichtkompetitive oder unkompetitive Hemmung, kann wie folgt begründet werden: Bei der am häufigsten vorkommenden Form der Hemmung, der kompetitiven Hemmung, wäre zwar wie in den gezeigten Messung der  $K_m$  bzw.  $K_R$ -Wert erhöht, der  $v_{max}$ -Wert wäre aber unverändert (siehe auch Kapitel 2.6) [117]. Dies ist bei den beschriebenen Hemmungen nicht gegeben, da der  $v_{max}$ -Wert bei den gehemmten Proben immer unter dem des Blanks lag. Bei einer nichtkompetitiven Hemmung wäre  $K_R$  unverändert und  $v_{max}$  wäre kleiner. Dies ist bei den beschriebenen Hemmungen anders, da  $v_{max}$  bei den gehemmten Proben immer unter dem des Blanks lag. Bei einer nichtkompetitiven Hemmung wäre  $K_m$  unverändert und  $v_{max}$  wäre kleiner, auch dies entspricht nicht den Daten (siehe auch 2.6) [117].



**Abbildung 4.5-16 Struktur/Wirkung:** Zusammenhang der Moleküleigenschaft (Unpolarität,  $K_{OW}$  und kritische-Mizellen-Konzentration, CMC zur relativen Hemmung  $K_R$ )

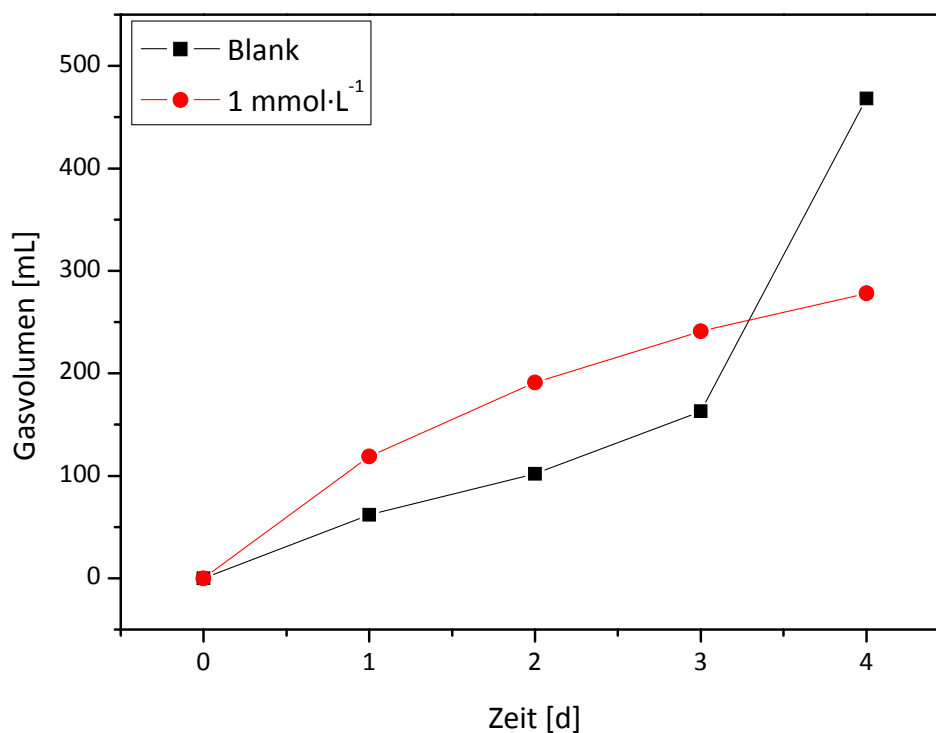
Außerdem konnte erstmalig qualitativ und quantitativ gezeigt werden, dass QACs in Mischung, wie sie in handelsüblichen Produkten normalerweise vorliegen bzw. wie sie in der Biogasanlage oder Umwelt vorkommen, synergetische Effekte aufweisen und eine 10 bis 100 mal höhere antimikrobiologische Wirkung besitzen. Gründe hierfür könnte sein, dass bereits bei geringen Konzentrationen gemischte Mizellen gebildet werden (Senkung der CMC Konzentration) und somit zu einem schnelleren Aufbrechen der Zellwand führen.

Ein weiterer Aspekt, der beobachtet wurde, ist das in der Anfangsphase der Versuche bei fast allen QACs es trotz späterer Hemmung zu einer schnelleren Biogasbildung gekommen ist. Dies könnte an dem verwendeten Testsubstrat, Cellulose und den Oberflächeneigenschaften der QACs liegen. Cellulose ist zwar eine polare Substanz, aber aufgrund seiner sekundären Struktur ist Cellulose nicht oder nur schwer wasserlöslich. Die QACs können somit als Lösungsvermittler dienen und Cellulose besser wasserlöslich machen. Durch ein Aufbrechen der sekundären Struktur kann die Cellulose leichter zugänglich gemacht werden für die enzymatische Hydrolyse. Ähnliches wurde für unpolare Tenside in Wechselwirkung mit Proteinen bereits durch Eckard [134] im Jahr 2014 beschrieben.



**Abbildung 4.5-17 Interaktion:** Beispiel der Einfluss von nicht-polaren Tensiden auf die Quartärstruktur von Proteinen (aus [134])

Die Cellulose fungiert in der Anfangsphase als alternative Bindungsstelle. Nach Ablauf der Hydrolyse sind die QACs wieder frei in Lösung vorhanden und wirken hemmend auf die Archaeen, was zu einem Absinken der Biogasproduktion führt. Dies erklärt warum die Biogasproduktion teilweise erst nach 1-2 Tage zum vollständigen Erliegen kommt und in der Anfangsphase, durch eine schnellere Hydrolyse, sogar mehr Biogas produziert wird.



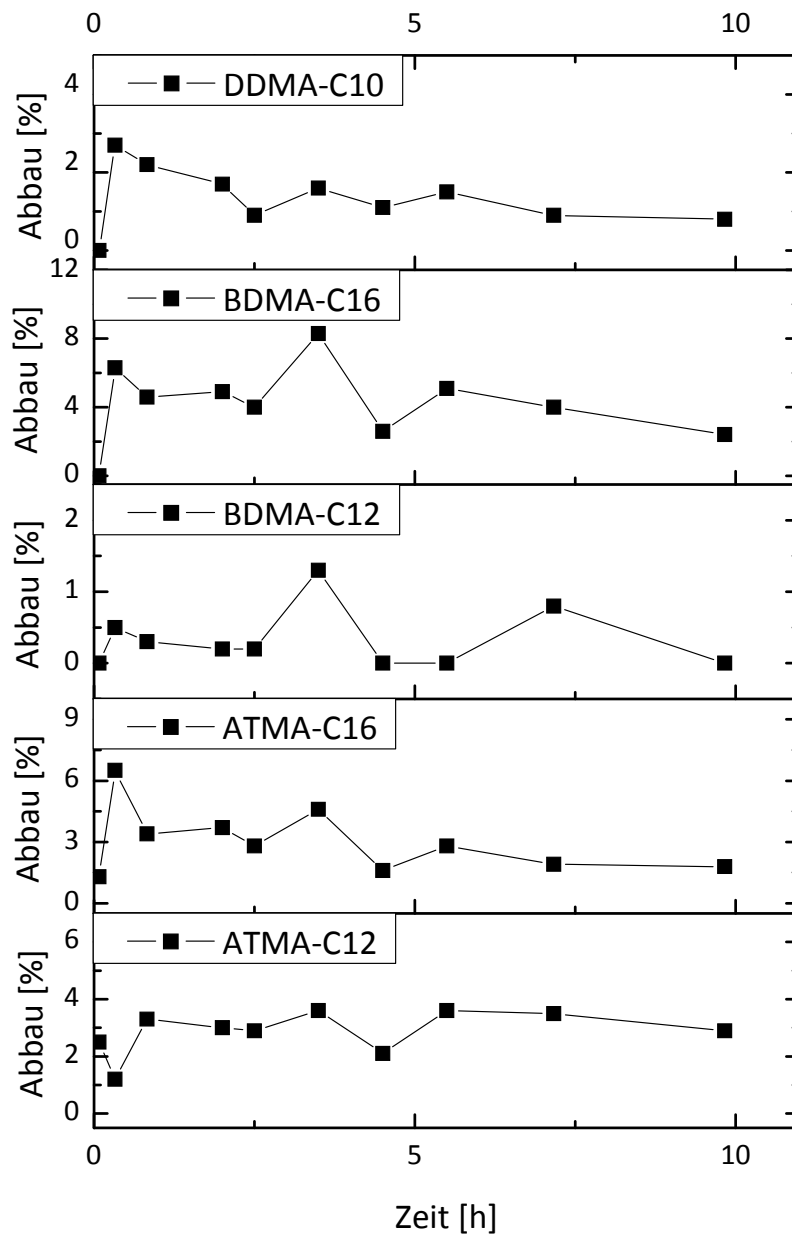
**Abbildung 4.5-18 Anfangsphase:** Beispiel eines Anfangsverlaufes der Substratumsetzung zu Biogas mit Blank und mit einer gehemmten Probe

#### 4.5.13 Aerober Abbau von QACs

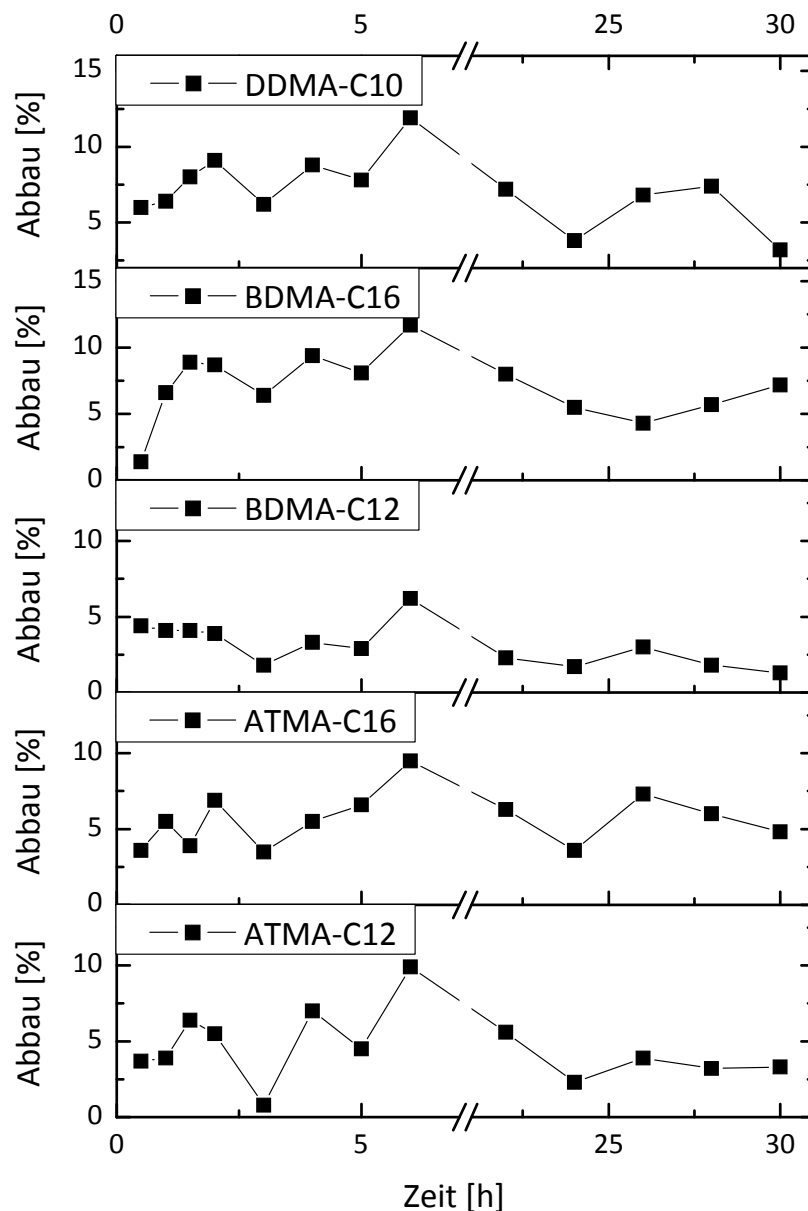
Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war es, das Abbauverhalten der QACs in dem Testsystem zu beschreiben. Die Betrachtung des Abbaus ist von weitreichendem Interesse, da wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben ein hoher Emissionsgrad von QACs in der Umwelt besteht. Dies gilt besonders für die Anwendung von Biogasanlagen, da Substratreste nach der vollständigen Vergärung als Wirtschaftsdünger verwendet werden darf und somit als Emissionsquelle in Frage kommen [56]. Aus der Literatur ist bekannt, dass QACs anaerob nicht abbaubar sind [44, 136]. Somit würde die QACs die Vergärung überstehen und vollständig in dem Restsubstrat vorhanden sein. Betrachtet wurde daher der aerobe Abbau in dem technischen Bioreaktorsystem (siehe 3.2) bei zwei unterschiedlichen Prozessbedingungen.

Beim ersten Versuch zum aeroben Abbau wurden Mikrobiofilmträgerwürfel (Levapro®) getestet, welche die aerobe Biomasse immobilisieren und somit zu einer besseren Prozessführung beitragen. Nach Zugabe der QACs wurde von Beginn an nur sehr geringe Konzentrationen von den fünf getesteten QACs detektiert. Die Wiederfindungsraten der Substanzen lagen in dem Testzeitraum bei 0 bis 8,3 %, was einer Eliminationsrate von ca. 90 % bis 100 % (siehe Abbildung 4.5-8) entspricht. Zwar gelten QACs unter aeroben Bedingungen [132, 136] generell als biologisch abbaubar, eine so schneller Abbau ist jedoch eher unwahrscheinlich. Für ein ähnliches QACs, dem Octadecyltrimethylammonium Chlorid, wurde von Games und King [136] eine Halbwertszeit von 2,5 h in Abwasser beschrieben. Da allerdings in diesen Fall bei allen getesteten QACs beim ersten Probenpunkt (5 min) bereits nur sehr geringen Konzentrationen gemessen wurden, ist nicht von einem Abbau auszugehen. Wie bereits unter Kapitel 2.2.5 erwähnt, neigen QACs aufgrund ihrer Eigenschaften dazu, an Oberflächen von Sedimentpartikeln und ähnlichem zu adsorbieren [135]. Da sich die Mikrobiofilmträgerwürfel durch eine besonders hohe Oberfläche auszeichnen, ist die Adsorption an diesem Material die wahrscheinliche Ursache für den hohen Eliminationsgrad was unter 4.5.14 näher untersucht wird. Daher ist auch eine kinetische Auswertung nicht möglich. Der zweite Versuch wurde daher ohne Mikrobiofilmträgerwürfeln wiederholt, um den Adsorptionseffekt dieser Materialien zu bewerten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.5-19 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die gemessenen Konzentrationen deutlich höher liegen als bei dem vorherigem Versuch. Auch konnten die QACs deutlich länger nachgewiesen werden und waren noch nach 30 h im unteren Prozentbereich nachweisbar (zum Vergleich: In Versuch 1 waren es 10 h). Allerdings scheint auch hier ein hoher Grad von Adsorption stattzufinden. Die maximale Wiederfindungskonzentration liegt nach 6 h bei 6,2 bis 11,9 %. Da Schlammflocken eine negative Ladung besitzen [55] haben die QACs aufgrund ihrer positiven Ladung eine hohe Affinität zu Schlammflocken. Clare et al. hat hierzu definiert, dass bei steigender Alkylkettenlänge die Affinität zur Adsorption steigt [137]. Analog dazu hat Ismail et al. [138] für vier der getesteten QACs folgende Adsorptionsaffinitäten definiert:

**ATMA-C16>BDMA-C16>BDMA-C12>ATMA-C12** [138]. Da sowohl für die Mikrobiofilmträgerwürfel als auch den verwendeten Klärschlamm keine Adsorptionsdaten vorhanden sind, wurden diese abschließend ermittelt, um nachzuweisen, dass es sich bei der Elimination in dem Testsystem um Adsorption und nicht um biologischen Abbau handelt. Dies ist in dem nachfolgenden Kapitel 4.5.14 beschrieben.



**Abbildung 4.5-19 Aerobes Abbau:** Abbaurate von ATMA-C12, ATMA-C16, BDMA-C12, BDMA-C16 und DDMA-C10 im aeroben Bioreaktor mit Levapro Mikrobiofilmkörpern



**Abbildung 4.5-20 Aerobes Abbau:** Abbauraten von ATMA-C12, ATMA-C16, BDMA-C12, BDMA-C16 und DDMA-C10 im aeroben Bioreaktor ohne Levapros Mikrobiofilmkörpern

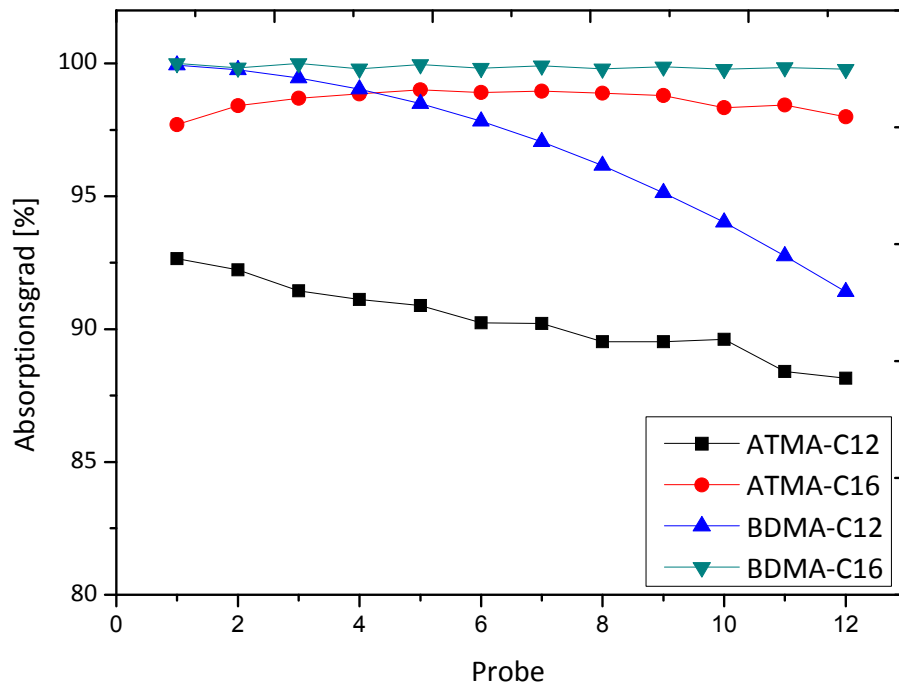
#### 4.5.14 Adsorption von QACs

Wie in 4.5.13 beschrieben, scheint im Bioreaktorsystem der Abbau von QACs durch Adsorption an den Mikrobiofilmkörpern und an Biomasse gehindert zu sein. Daher wurde in den folgenden Versuchen der Nachweis der Adsorption der QACs an beiden Materialien getestet. In Abbildung 4.5-21 sind die unterschiedlichen Adsorptionsgrade der QACs an den Mikrobiofilmträgerwürfeln bei steigender Konzentration aufgetragen. Dabei ist zu erkennen, dass der Adsorptionsgrad bei allen vier Substanzen (88 %) sehr hoch liegt. Für die BDMA-C16 liegt der Adsorptionsgrad über den kompletten getesteten Konzentrationsbereich bei über 99 %. Ähnliches gilt für ATMA-C16, wo der

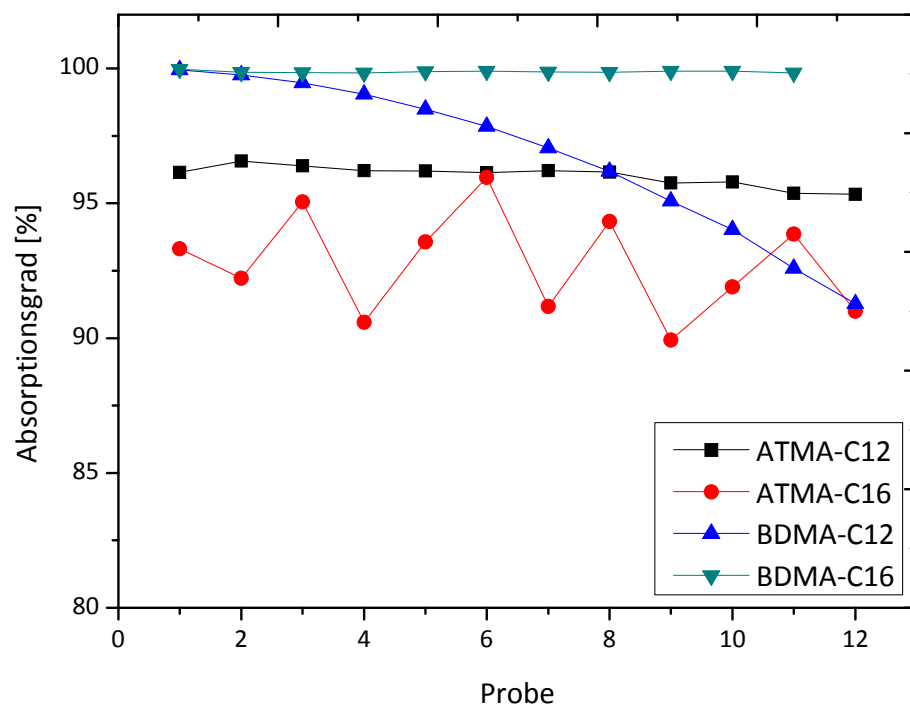
Adsorptionsgrad bei 98 % bis 99 % liegt. Dies entspricht den Beobachtungen von Ismail et al., welche eine höhere Affinität längerer Alkylketten beschreiben [138]. Seine grobe Einteilung in ATMA-C16 > BDMA-C16 konnten hier allerdings nicht bestätigt werden, die Werte liegen aber sehr nah beieinander. Die beiden Moleküle mit den kürzeren Alkylketten zeigen hier zum einen eine geringere Adsorptionsaffinität und zum anderen sinkt diese mit steigender Testkonzentration. Ismail Zuordnung BDMA-C12>ATMA-C12 konnte bestätigt werden.

Die Adsorptionen der QACs an die Schlammpartikel sind in Abbildung 4.5-22 gezeigt. BDMA-C16 besitzt auch hier eine sehr hohe Adsorptionsaffinität, analog zu den Ergebnissen der Adsorption an den Mikrobiofilmträgerwürfel. ATMA-C16 besitzt die geringste Affinität. Die Schwankung liegt bei <2 %. BDMA-C12 hat besonders bei den geringeren Konzentrationen eine höhere Affinität als ATMA-C12. Die drei Substanzen BDMA-C16, ATMA-C16 und BDMA-C12 zeigen das gleiche Adsorptionsverhalten wie bei den Mikrobiofilmträgerwürfel. Vergleicht man die Werte mit den Versuchen von Ismail sind leichte Unterschiede zu erkennen [138]. Dies ist vor allem auf die Versuchsplanung zurückzuführen. Hier wurden innerhalb kurzer Zeit nach und nach die Konzentrationen erhöht. Ismail hingegen hat nur einen Konzentrationsbereich ( $300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) getestet und die Adsorptionszeit variiert. Eine direkte Übertragung der Aussagen ist somit nur schwer möglich. Zusätzlich ist auch der verwendete aerobe Schlamm nicht direkt vergleichbar, auch wenn Parameter wie pH-Wert und TS gleich gehalten wurden. Allerdings lässt sich abschließend sagen, dass sich anhand der Ergebnisse dieser beiden Versuche zeigt, dass für die Elimination in dem Testsystem vorwiegend Adsorption-Effekte eine Rolle spielen. Die rasche Eliminationsrate wird nicht durch aeroben Abbau hervorgerufen. Ähnliches ist auch in der Umwelt zu erwarten, so dass QACs eher im Boden oder Sediment (z.B. auch Klärschlamm) abgebaut werden als durch Mikroorganismen in z.B. Kläranlagen.





**Abbildung 4.5-21 Adsorption Mikrobewuchskörper:** Adsorptionsverhalten von ATMA-C12, ATMA-C16, BDMA-C12, BDMA-C16 mit zunehmender Konzentration an Mikrobewuchskörper



**Abbildung 4.5-22 Adsorption Schlamm:** Adsorptionsverhalten von ATMA-C12, ATMA-C16, BDMA-C12, BDMA-C16 mit zunehmender Konzentration an Schlammflocken

## 5 Zusammenfassung

Ziel der Untersuchungen war es zu testen, ob quaternäre Ammoniumverbindungen, wie sie in der veterinären Desinfektion eingesetzt werden, einen biologischen Effekt auf die Biogaserzeugung haben. Dabei sollte sowohl im ersten Schritt die Frage zu den Einzelsubstanzen veranschaulicht werden, welche bereits bei Konzentrationen von 1 bis 5 mmol·L<sup>-1</sup> zu einer geminderten Biogasbildung führen. Dieser Konzentrationsbereich ist interessant, da Konzentrationen dieser Höhe in Biogasanlagen nachgewiesen wurden [58, 59, 66, 133]. Gemäß den kinetischen Auswertungen konnte herausgestellt werden, dass es sich bei der verminderten Biogaserzeugung nicht um eine klassische Hemmung sondern eine durch Lysis induzierte Intoxikation der Biomasse handelt. Da Intoxikationen nicht reversibel sind, sondern die Biomasse nachhaltig schädigen, sollte der Eintrag von QACs in der Biogasanlage und andere mikrobiologische Systeme vermieden werden. Aus den systematischen Untersuchungen konnte folgende Reihenfolge der Zunahme an Toxizität definiert werden: **ATMA-C12 < BDMA-C12 < DDMA-C10 < BDMA-C16 < ATMA-C16**. Generell gilt somit, dass mit zunehmender Hydrophilie die Toxizität steigt. Ähnliche Beobachtungen haben auch Tezel et al. 2007 [44] beschrieben. Darüber hinaus konnte anhand der Fettsäureprofile festgestellt werden, dass überwiegend die Methanogenen von der Lysis betroffen sind, was bis jetzt nur unzureichend beschrieben wurde [13]. In einem zweiten Schritt sollte beantwortet werden, ob QACs als Mischung in anaeroben Systemen einen synergistischen Effekt haben. Studien, welche die biologische Aktivität der QACs auf Mikroorganismen beschrieben haben, behandeln nur die einzelnen Verbindungen oder Mischungen von QACs mit anderen Substanzen [13, 44, 55, 132, 140]. Die Ermittlung der synergistischen Effekte ist aber von großem Interesse, da veterinäre Handelsprodukte in der Regel aus mehreren Komponenten bestehen und auch in den Biogasanlagen eine Vielzahl von unterschiedlichen QACs detektiert wurden [58, 59, 66, 133]. Die Untersuchungen zeigten, dass die Mischungen BDMA-C12/BDMA-C16 und BDMA-C12/BDMA-C16/DDMA-C12 einen deutlichen synergistischen Effekt führen können. Ähnliche Beobachtungen machte Sütterlin et al. für die Mischung aus BDMA-C12 und BDMA-C14 in Verbindung mit LAS (engl. *linear alkylbenzene sulfonate*), SDS (engl. *sodium dodecylsulfonate*), BSA (engl. *benzene sulfonic acid*) und NSA (engl. *naphthalene sulfonic acid*), welche einen synergistischen Effekt auf das gram-negative Bakterium *Pseudo putida* und das marine gram-negative Bakterium *Vibrio fischeri* aufweisen. Gemäß der Ergebnissen wurde ein synergistischer Effekt um das 10 bis 100-fache auf die methanogene Mischkultur erreicht. Die Mischung aus BDMA-C12, BDMA-C16 und DDMA-C10 zeigte hierbei die höchste Wirkung.

Neben der verminderten Biogasbildung konnte auch ein positiver Effekt auf die Hydrolyse festgestellt werden. Hierbei zeigten die Proben eine gegenüber den Blanks höhere Biogasbildung in der Anfangsphase, auch wenn es in den folgenden Tagen teilweise zum kompletten Erliegen der

Biogasproduktion kam. Als Grund hierfür wird das Aufbrechen der quaternären Cellulose-Struktur vermutet, ähnlich wie es Eckard et al. [134] für nichtionische Tenside und Proteine beschrieben haben. Auch in anderen biochemischen Prozessen werden oberflächenaktive Stoffe als Phasenvermittler oder Hilfsmittel verwendet [140]. Grundsätzlich wäre es denkbar, dass man auch z.B. QACs als Hydrolysehilfsmittel für die Biogasproduktion verwendet. Voraussetzung hierfür wäre zum Beispiel ein zweistufiges Biogasverfahren, in dem die Methanogenese auch räumlich von der Hydrolyse getrennt abläuft oder eine reine enzymatische Vorstufe zur Vorbereitung des Substrates eingesetzt wird.

Die Entsorgung von QACs aus Spülwasser kann in der Landwirtschaft über zwei Verfahren erfolgen. Entweder kann das Spülwasser zusammen mit der Gülle als Wirtschaftsdünger direkt auf Feld aufgebracht werden oder es wird über die Biogasanlage entsorgt. Da QACs anaerob in der Biogasanlage nicht abgebaut werden [135], gelangt auch hier anschließend mit QACs belasteter Wirtschaftsdünger auf die Felder. Beides sind somit potentielle Emissionsquellen für QACs. Hieraus ergab sich die Fragestellung für diese Arbeit, inwieweit QACs aerob abgebaut bzw. eliminiert werden. Hierzu wurde das Bioreaktorsystem 1 unter aerober Fahrweise verwendet. Es zeigte sich, dass die Eliminationsrate von QACs sehr hoch lag. Innerhalb kürzester Zeit wurden Werte von über 90 % erreicht. Hierbei handelte es sich aber nicht um einen aeroben Abbau sondern, wie gezeigt wurde, um Adsorption. Eine Entsorgung als Wirtschaftsdünger ist daher nicht zu empfehlen, da eine Akkumulation in der Umwelt nicht ausgeschlossen werden kann. Die Verbreitung von QACs über den Wirtschaftsdünger sieht auch das Umweltbundesamt Österreich kritisch [66, 139]. Dies gilt nicht nur für QACs, auch weitere anthropogene Stoffe (z.B. Antibiotika) können über diesen Weg in die Umwelt gelangen. Daher empfiehlt es sich, dass grundsätzlich nach der Stalldesinfektion das angefallene Spülwasser separat aufgefangen wird.

Eine effektivere, simplere und gleichzeitig kostengünstige Methode wäre, das anfallende Spülwasser über eine vor Ort installierte aerobe Klär- oder Sickergrube zu entsorgen. Voraussetzung hierbei wäre natürlich, dass beim Versickern nicht das Grundwasser belastet wird. Bei Stallanlagen bei denen dies nicht ausgeschlossen werden kann (z. B. Wasserschutzgebieten) müsste das Spülwasser in die aerobe Behandlung einer kommunalen Kläranlage gegeben werden. Die Verwendung von Desinfektionsmitteln, welche neben den getesteten QACs, ebenfalls leichter abbaubaren Ester-QACs (oder Esterquats) enthalten wäre ebenfalls sinnvoll. Hierbei tragen die Esterquats aber nicht zur Desinfektion, sondern nur als Reinigungskomponente bei. Ein vollständiger Austausch von QACs zu Esterquats wäre hingegen aufgrund der fehlenden Desinfektionskraft nicht möglich [141].

## 6 Literatur

- [1] Strom-Report, Stromerzeugung 2015 in Deutschland nach Energieträgern, [Online] Verfügbar: <http://strom-report.de/strom-vergleich/#stromerzeugung-2015>, [Zugriff: 09.02.2017].
- [2] Umweltbundesamt (UBA), Biogaserzeugung und -nutzung: Ökologische Leitplanken für die Zukunft, *Vorschläge der Kommission Landwirtschaft beim Umweltbundesamt (KLU)*, S. 26, 2013, [Online] Verfügbar: <https://www.umweltbundesamt.de/publikationen/biogaserzeugung-nutzung-oekologische-leitplanken>, [Zugriff: 24.07.2017].
- [3] Erneuerbare-Energie-Gesetz (EEG-2017), §4, Abs. 2. S. 10.
- [4] Erneuerbare-Energie-Gesetz (EEG-2017), §28, Abs. 3. S. 21.
- [5] Erneuerbare-Energie-Gesetz (EEG-2017), §39h Abs. 1. S. 38.
- [6] Erneuerbare-Energie-Gesetz (EEG-2017), §44. S. 42.
- [7] Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft e.V., Glyphosat - Verantwortungsvoller Umgang mit einem Wirkstoff, *DLG-Merkblatt 391*, Frankfurt, 2015, [Online] Verfügbar: [http://www.dlg.org/dlg-merkblatt\\_391.html](http://www.dlg.org/dlg-merkblatt_391.html), [Zugriff: 24.07.2017].
- [8] Krüger, M., Shehata, A. A., Schrödl, W., and Rodloff, A., Glyphosate suppresses the antagonistic effect of *Enterococcus* spp. on *Clostridium botulinum*, *Anaerobe*, vol. 20, pp. 74–78, Apr. 2013.
- [9] Vitz, H., Strzysch, I., Kiffmeyer T., Türk J., Entwicklung eines mikrobiellen Schnelltests zur Identifizierung von Hemmstoffen bei anaeroben Gärprozessen, *Abschlussbericht AiF-FV-Nr. 185 Z*, Duisburg/Oberhausen/Hannover, 2008.
- [10] Bunzel, K., Schäfer, R. B., Thrän, D., and Kattwinkel, M., Pesticide runoff from energy crops: A threat to aquatic invertebrates?, *Sci. Total Environ.*, vol. 537, no. 15, pp. 187–196, 2015.
- [11] Daouk, S., de Alencastro, L. F., and Pfeifer, H.-R., The herbicide glyphosate and its metabolite AMPA in the Lavaux vineyard area, western Switzerland: proof of widespread export to surface waters. Part II: the role of infiltration and surface runoff, *J. Environ. Sci. Health. B.*, vol. 48, no. 9, pp. 725–736, 2013.
- [12] Chen, J. L., Ortiz, R., Steele, T. W. J., and Stuckey, D. C., Toxicants Inhibiting Anaerobic Digestion: A Review, *Biotechnol. Adv.*, vol. 32, no. 8, pp. 1523-1534, Oct. 2014.
- [13] Tezel, U., Pierson, J. A., and Pavlostathis, S. G., Effect of polyelectrolytes and quaternary ammonium compounds on the anaerobic biological treatment of poultry processing wastewater., *Water Res.*, vol. 41, no. 6, pp. 1334–1342, Mar. 2007.
- [14] Lancaster, S. H., Hollister, E. B., Senseman, S. A., and Gentry, T. J., Effects of repeated glyphosate applications on soil microbial community composition and the mineralization of glyphosate, *Pest Manag. Sci.*, vol. 66, no. 1, pp. 59–64, Jan. 2010.
- [15] Duke, S. O. and Powles, S. B., Glyphosate: A once-in-a-century herbicide, *Pest Manag. Sci.*, vol. 64, no. 4, pp. 319–325, Apr. 2008.

- [16] Steinmann, H.-H., Glyphosat – ein Herbizid in der Diskussion und die Suche nach dem „Notwendigen Maß“, *Gesunde Pflanzen*, Ver. 65, Nr. 2, S. 47–56, Juni 2013.
- [17] EU Kommission, Durchführungsverordnung (EU) 2015/1885 Der Kommission vom 20. Oktober 2015 zur Änderung der Durchführungsverordnung (EU) Nr. 540/2011, *Amtsblatt der Europäischen Union*, 2015.
- [18] Gasnier, C., Dumont, C., Benachour, N., Clair, E., Chagnon, M. C., and Séralini, G. E., Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines, *Toxicology*, vol. 262, no. 3, pp. 184–191, Jun. 2009.
- [19] Kwiatkowska, M., Huras, B., and Bukowska, B., The effect of metabolites and impurities of glyphosate on human erythrocytes (in vitro), *Pestic. Biochem. Physiol.*, vol. 109, pp. 34–43, Feb. 2014.
- [20] Mesnage, R., Defarge, N., de Vendomois, J. S., and Seralini, G. E., Major pesticides are more toxic to human cells than their declared active principles, *BioMed Res. Int.*, vol. 2014, no. 179691, Feb. 2014.
- [21] Mink, P. J., Mandel, J. S., Scurman, B. K., and Lundin, J. I., Epidemiologic studies of glyphosate and cancer: a review., *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 63, no. 3, pp. 440–452, Aug. 2012.
- [22] Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Stellungnahme zu „ Major pesticides are more toxic to human cells than their declared active principles “ von Robin Mesnage , Nicolas Defarge , Joël Spiroux de Vendômois und Gilles-Eric Séralini, *Stellungnahme Nr. 011/2014 des BfR*, S. 1–4, März 2014.
- [23] Baylis, A. D., Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects, *Pest Manag. Sci.*, vol. 56, no. 4, pp. 299–308, Apr. 2000.
- [24] Laitinen, P., Rämö, S., Nikunen, U., Jauhiainen, L., Siimes, K., and Turtola, E., Glyphosate and phosphorus leaching and residues in boreal sandy soil, *Plant Soil*, vol. 323, no. 1–2, pp. 267–283, Oct. 2009.
- [25] Roy, D. N., Konar, S. K., Banerjee, S., Charles, D. A., Thompson, D. G., and Prasad, R., Persistence, movement, and degradation of glyphosate in selected Canadian boreal forest soils, *J. Agric. Food Chem.*, vol. 37, no. 2, pp. 437–440, Mar. 1989.
- [26] Stenrød, M., Eklo, O. M., Charnay, M.-P., and Benoit, P., Effect of freezing and thawing on microbial activity and glyphosate degradation in two Norwegian soils, *Pest Manag. Sci.*, vol. 61, no. 9, pp. 887–898, Sep. 2005.
- [27] Dickeduisberg, M., Steinmann, H.-H., und Theuvsen, L., Erhebungen zum Einsatz von Glyphosat im deutschen Ackerbau, [Konferenzbeitrag] 25<sup>th</sup> Ger. Conf. Weed Biol. Weed Control, 13.-15. März 2012, Braunschweig, 2012.
- [28] Zulet, A., Gil-Monreal, M., Villamor, J. G., Zabalza, A., van der Hoorn, R. A. L., and Royuela, M., Proteolytic pathways induced by herbicides that inhibit amino acid biosynthesis, *PLOS One*, vol. 8, no. 9, p. e73847, Jan. 2013.

- [29] Krüger, M., Shehata, A. A., Grosse-Herrenthey, A., Ständer, N., and Schrödl, W., Relationship between gastrointestinal dysbiosis and *Clostridium botulinum* in dairy cows, *Anaerobe*, vol. 27, pp. 100–105, Jun. 2014.
- [30] Shehata, A. a, Schrödl, W., Aldin, A. A., Hafez, H. M., and Krüger, M., The effect of glyphosate on potential pathogens and beneficial members of poultry microbiota in vitro, *Curr. Microbiol.*, vol. 66, no. 4, pp. 350–358, Apr. 2013.
- [31] Glass, R. L., Adsorption of Glyphosate by Soils and Clay Minerals, *J. Agric. Food Chem.*, vol. 35, no. 4, pp. 497–500, Jul. 1987.
- [32] Sprankle, P., Meggitt, W. F., Adsorption, Mobility, and Microbial Degradation of Glyphosate in the Soil, *Weed Sci.*, vol. 23, no. 3, pp. 229–234, May 1975.
- [33] Dick, R. E. and Quinn, J. P., Glyphosate-degrading isolates from environmental samples: occurrence and pathways of degradation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 43, no. 3, pp. 545–550, 1995.
- [34] Schuette, J., Environmental fate of glyphosate, *Environmental Monitoring & Pest Management*, Department of Pesticide Regulation, Sacramento, p. 1, Nov. 1998.
- [35] Helander, M., Saloniemi, I., and Saikkonen, K., Glyphosate in northern ecosystems, *Trends Plant Sci.*, vol. 17, no. 10, pp. 569–574, Oct. 2012.
- [36] Zhao, Y., Wendling, L. A., Wang, C., and Pei, Y., Use of Fe/Al drinking water treatment residuals as amendments for enhancing the retention capacity of glyphosate in agricultural soils, *J. Environ. Sci.*, vol. 34, no. 1, pp. 133–142, Aug. 2015.
- [37] Borggaard, O. K. and Gimsing, A. L., Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review, *Pest Manag. Sci.*, vol. 64, no. 4, pp. 441–456, Apr. 2008.
- [38] Gimsing, A. L., Borggaard, O. K., and Bang, M., Influence of soil composition on adsorption of glyphosate and phosphate by contrasting Danish surface soils, *Eur. J. Soil Sci.*, vol. 55, no. 1, pp. 183–191, Mar. 2004.
- [39] Skeff, W., Neumann, C., and Schulz-Bull, D. E., Glyphosate and AMPA in the estuaries of the Baltic Sea method optimization and field study, *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 100, no. 1, pp. 577–585, Nov. 2015.
- [40] van Stempvoort, D. R., Roy, J. W., Brown, S. J., and Bickerton, G., Residues of the herbicide glyphosate in riparian groundwater in urban catchments., *Chemosphere*, vol. 95, pp. 455–463, Jan. 2014.
- [41] Struger, J., van Stempvoort, D. R., and Brown, S. J., Sources of aminomethylphosphonic acid (AMPA) in urban and rural catchments in Ontario, Canada: Glyphosate or phosphonates in wastewater?, *Environ. Pollut.*, vol. 204, pp. 289–297, Sep. 2015.
- [42] Botta, F., Lavison G., Couturier G., Alliot F., Moreau-Guigon E., Fauchon N., Guery B., Chevreuil M., Blanchoud H., Transfer of glyphosate and its degradate AMPA to surface waters through urban sewerage systems, *Chemosphere*, vol. 77, no. 1, pp. 133–139, Sep. 2009.

- [43] Tsui, M. T. K. and Chu, L. M., Environmental fate and non-target impact of glyphosate-based herbicide (Roundup) in a subtropical wetland, *Chemosphere*, vol. 71, no. 3, pp. 439–46, Mar. 2008.
- [44] Tezel, U., Fate and Effect of Quaternary Ammonium Compounds in Biological Systems Fate and Effect of Quaternary Ammonium, [Dissertation], *Georgia Institute of Technology*, May, 2009.
- [45] van Ginkel, C. G., Biodegradability of cationic surfactants, *Biodegradability of Surfactants*, Karsa D.R. and Porter M. R. (Eds.), Dordrecht, Springer Netherlands, 1995, pp. 183–203, ISBN: 978-94-010-4588-9.
- [46] Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG), 13. Liste geprüften und als wirksam befundenen Desinfektionsmittel für den Tierhaltungsbereich, 2016, [Online] Verfügbar: <http://www.desinfektion-dvg.de/index.php?id=1800> [Zugriff 24.07.2017].
- [47] Kupper, T., Biozid-Produkte für die Hygiene im Veterinärbereich, Bern, 2013.
- [48] Menno Chemie-Vertrieb GmbH, MENNO Hygienemanagement, [Online] Verfügbar: [http://www.menno.de/fileadmin/user\\_upload/MENNO\\_Hygienemanagement\\_05-06.pdf](http://www.menno.de/fileadmin/user_upload/MENNO_Hygienemanagement_05-06.pdf), [Zugriff 24.07.2017].
- [49] Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Gesundheitliche Bewertung der Rückstände von Benzalkoniumchlorid in Lebensmitteln, *Stellungnahme Nr. 032/2012*, Juli 2012
- [50] Hugo, W. B. and Longworth, A. R., The effect of chlorhexidine on the electrophoretic mobility, cytoplasmic constituents, dehydrogenase activity and cell walls of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 18, no. 9, pp. 569–578, 1966.
- [51] Gilbert, P. and Moore, L. E., Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet, *J. Appl. Microbiol.*, vol. 99, no. 4, pp. 703–15, Jan. 2005.
- [52] Devlin, T. M., Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations, Wiley-Liss, Michigan, 1997, ISBN: 978-0-471-67808-3.
- [53] Lehninger, A. L., Nelson, D. L., and Cox, M. M., Lehninger Principles of Biochemistry. W. H. Freeman, 2005, ISBN: 987-1-464-12611-6.
- [54] van Ginkel, C. G., van Dijk, J. B., and Kroon, A. G., Metabolism of hexadecyltrimethylammonium chloride in *Pseudomonas* strain B1, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 58, no. 9, pp. 3083–3087, Sep. 1992.
- [55] Rowe, D. R. and Abdel-Magid, I. M., Handbook of Wastewater Reclamation and Reuse, Taylor & Francis, London, 1995, ISBN: 978-0-873-71671-0.
- [56] Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMEL), Verordnung über das Inverkehrbringen von Düngemitteln, Bodenhilfsstoffen, Kultursubstraten und Pflanzenhilfsmitteln, *Düngemittelverordnung - DüMV*, Ver. 1, Nr. 11, 2008.
- [57] Martínez-Carballo, E. et al., Determination of selected quaternary ammonium compounds by liquid chromatography with mass spectrometry. Part I. Application to surface, waste and indirect discharge water samples in Austria, *Environ. Pollut.*, vol. 145, no. 2, pp. 489–496, Jan. 2007.

- [58] Martínez-Carballo, E., González-Barreiro, C., Sitka, A., Kreuzinger, N., Scharf, S., and Gans, O., Determination of selected quaternary ammonium compounds by liquid chromatography with mass spectrometry. Part II. Application to sediment and sludge samples in Austria, *Environ. Pollut.*, vol. 146, no. 2, pp. 543–547, Mar. 2007.
- [59] Kreuzinger, N., Fuerhacker, M., Scharf, S., Uhl, M., Gans, O., and Grillitsch, B., Methodological approach towards the environmental significance of uncharacterized substances — quaternary ammonium compounds as an example, *Desalination*, vol. 215, no. 1–3, pp. 209–222, Sep. 2007.
- [60] Martínez-Carballo, E. et al., Determination of selected quaternary ammonium compounds by liquid chromatography with mass spectrometry. Part I. Application to surface, waste and indirect discharge water samples in Austria, *Environ. Pollut.*, vol. 145, no. 2, pp. 489–496, Jan. 2007.
- [61] Merino, F., Rubio, S., and Pérez-Bendito, D., Mixed aggregate-based acid-induced cloud-point extraction and ion-trap liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of cationic surfactants in sewage sludge, *J. Chromatogr. A*, vol. 998, no. 1–2, pp. 143–154, May 2003.
- [62] Li, X., Luo, X., Mai, B., Liu, J., Chen, L., and Lin, S., Occurrence of quaternary ammonium compounds (QACs) and their application as a tracer for sewage derived pollution in urban estuarine sediments, *Environ. Pollut.*, vol. 185, pp. 127–133, Oct. 2014.
- [63] Ding, W. and Liao, Y., Determination of Alkylbenzyltrimethylammonium Chlorides in River Water and Sewage Effluent by Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography / Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, vol. 73, no. 1, pp. 36–40, Jan. 2001.
- [64] Ferrer, I. and Furlong, E. T., Identification of alkyl dimethylbenzylammonium surfactants in water samples by solid-phase extraction followed by ion trap LC/MS and LC/MS/MS, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 35, no. 12, pp. 2583–2588, 2001.
- [65] Scheffknecht, C., Eberhard, W., Gans, O., und Scharf, S., Biogasgülle, Nähr- und Schadstoffgehalte in Gärrückständen, *Bericht UI/Vle-7/2007*, Bregenz, 2007.
- [66] Núñez, O., Moyano, E., and Galceran, M. T., Determination of quaternary ammonium biocides by liquid chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, vol. 1058, no. 1–2, pp. 89–95, Nov. 2004.
- [67] Gerba, C. P., Quaternary ammonium biocides: Efficacy in application, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 81, no. 2, pp. 464–469, Oct. 2015.
- [68] Cheng, L., Jiang, X., Relationship between the concentrations, ionic types and molecular structures of surfactants and their toxicity, *Chin. J. Environ. Sci. Manag.*, 2006.
- [69] Jing, G., Zhou, Z., and Zhuo, J., Quantitative structure-activity relationship (QSAR) study of toxicity of quaternary ammonium compounds on *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus quadricauda*, *Chemosphere*, vol. 86, no. 1, pp. 76–82, Jan. 2012.
- [70] Nishihara, T., Okamoto, T., and Nishiyama, N., Biodegradation of didecyldimethylammonium chloride by *Pseudomonas fluorescens* TN4 isolated from activated sludge, *J. Appl. Microbiol.*, vol. 88, no. 4, pp. 641–647, Apr. 2000.



- [71] Brunstermann, R., Entwicklung eines zweistufigen anaeroben Verfahrens zur kontinuierlichen Wasserstoff- und Methanerzeugung aus organischen Abfällen und Abwässern, [Dissertation], Universität Duisburg-Essen, 2010, ISBN 978-3-8322-9570-7.
- [72] Mähnert, P., Kinetik der Biogasproduktion aus nachwachsenden Rohstoffen und Gülle, [Dissertation], Humboldt-Universität zu Berlin, 2007.
- [73] Bischofsberger, W., Dichtl, N., Rosenwinkel, K. H., Seyfried, C. F., und Böhnke, B., Anaerobtechnik, Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2005, ISBN 978-3-642-24895-5.
- [74] Madsen, M., Holm-Nielsen, J. B., and Esbensen, K. H., Monitoring of anaerobic digestion processes: A review perspective, *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 15, no. 6, pp. 3141–3155, Aug. 2011.
- [75] Gunnerson, C. G. and Stuckey, D. C., Anaerobic Digestion: Principles and Practices for Biogas Systems, *Technical Paper 46*, World Bank, Washington D.C., 1986.
- [76] Weiland, P., Grundlagen der Methangärung - Biologie und Substrate, in Biogas als regenerative Energie - Stand und Perspektiven, *VDI-Bericht 1620*, S. 19–32, 2001.
- [77] Scheftelowitz, M. et al., Stromerzeugung aus Biomasse (Vorhaben Ila Biomasse) *Zwischenbericht Mai 2015*, P.-Nr. 03MAP250, Ver. 49, S. 24–25, März 2015.
- [78] Linke, B.; Heiermann, M.; Grundmann, P.; Hertwig, F., Grundlagen, Verfahren und Potenzial der Biogasgewinnung im Land Brandenburg, *Leitfaden Biogas*, Potsdam, S. 10–23, Juni 2011.
- [79] McLennan, F. and Kowalski, B. R., Process Analytical Chemistry, Springer Netherlands, 1995, ISBN 978-94-011-0591-0.
- [80] Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe (FNR), Leitfaden Biogas - Von der Gewinnung zur Nutzung, *Leitfaden Biogas*, Gülzow, 2010, ISBN 3-00-014333-5.
- [81] Deutsches Institut für Normung, DIN EN ISO 11734, 1998-11.
- [82] Feitkenhauer, H., von Sachs, J., and Meyer, U., On-line titration of volatile fatty acids for the process control of anaerobic digestion plants, *Water Res.*, vol. 36, no. 1, pp. 212–218, Jan. 2002.
- [83] Powell, G. E. and Archer, D. B., On-line titration method for monitoring buffer capacity and total volatile fatty acid levels in anaerobic digesters, *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 33, no. 5, pp. 570–577, Jan. 1989.
- [84] Neßler, J., Über das Verhalten des Jodquecksilbers und der Quecksilberverbindungen überhaupt zu Ammoniak und über eine neue Reaction auf Ammoniak, [Dissertation], Universität Freiburg, 1856.
- [85] Ebel, S. Lexikon der Pharmazie, 1. Auflage., H. J. Roth, Ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, p. 461, 1987, ISBN: 978-3-137-15201-9.

- [86] Ullah, M. A., Kim, K.-H., Szulejko, J. E., and Cho, J., The gas chromatographic determination of volatile fatty acids in wastewater samples: Evaluation of experimental biases in direct injection method against thermal desorption method, *Anal. Chim. Acta*, vol. 820, no. 11, pp. 159-167 Apr. 2014.
- [87] Raposo, F., Borja, R., and Cacho, J. a., First international comparative study of volatile fatty acids in aqueous samples by chromatographic techniques: Evaluating sources of error, *TrAC Trends in Anal. Chem.*, vol. 51, pp. 127-143, Nov. 2013.
- [88] Rehorek, A., Urbig, K., Meurer, R., Schäfer, C., Plum, A., and Braun, G., Monitoring of azo dye degradation processes in a bioreactor by on-line high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, vol. 949, no. 1-2, pp. 263-268, Mar. 2002.
- [89] Plum, A. and Rehorek, A., Strategies for continuous on-line high performance liquid chromatography coupled with diode array detection and electrospray tandem mass spectrometry for process monitoring of sulphonated azo dyes and their intermediates in anaerobic-aerobic bioreactors, *J. Chromatogr. A*, vol. 1084, no. 1-2, pp. 119-133, Mar. 2005.
- [90] Plum, A. and Rehorek, A., Strategies for continuous on-line high performance liquid chromatography coupled with diode array detection and electrospray tandem mass spectrometry for process monitoring of sulphonated azo dyes and their intermediates in anaerobic-aerobic bioreactors, *J. Chromatogr. A*, vol. 1084, no. 1-2, pp. 119-133, Aug. 2005.
- [91] Rehorek, P., Plum, A., Senholdt, M. E. M., Gornacka, M. E. B., Györgyicze, D. C., und Yildiz, D. B., Abschlussbericht Forschungsprojekt zur Verbesserung des Abbaus von Textilabwässern in einem anaerob / aerob Reaktor zur Vorbehandlung von Abwasserkonzentraten, April 2006, ISBN: 978-3-00-019432-0.
- [92] Hepburn, C. A., Vale, P., Brown, A. S., Simms, N. J., and McAdam, E. J., Development of on-line FTIR spectroscopy for siloxane detection in biogas to enhance carbon contactor management, *Talanta*, vol. 141, pp. 128-136, Auf. 2015.
- [93] Eccleston, R., Wolf, C., Balsam, M., Schulte, F., Bongards, M., and Rehorek, A., Mid infrared spectroscopy for monitoring of AD processes - Prospects and Challenges, *Chem. Eng. Technol.*, vol. 39, no. 4, pp. 627-636, Apr. 2015.
- [94] Stockl, A. and Oechsner, H., Near-infrared spectroscopic online monitoring of process stability in biogas plants, *Eng. Life Sci.*, vol. 12, no. 3, pp. 295-305, Jun. 2012.
- [95] Gey, M. H., Chromatographie 1: LC - HPLC - UHPLC, in Instrumentelle Analytik und Bioanalytik, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2015, S. 117, ISBN: 978-3-662-46254-6.
- [96] Gey, M. H., Chromatographie 1: LC - HPLC - UHPLC, in Instrumentelle Analytik und Bioanalytik, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2015, S. 109, ISBN: 978-3-662-46254-6.
- [97] Gey, M. H., Chromatographie 1: LC - HPLC - UHPLC, in Instrumentelle Analytik und Bioanalytik, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2015, S. 113-117, ISBN: 978-3-662-46254-6.

- [98] Gey, M. H., Chromatographie 1: LC - HPLC - UHPLC, in Instrumentelle Analytik und Bioanalytik, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2015, S. 114, ISBN: 978-3-662-46254-6..
- [99] Gey, M., Chromatographie 1: LC - HPLC - UHPLC, in Instrumentelle Analytik und Bioanalytik, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2015, S. 110–112, ISBN: 978-3-662-46254-6.
- [100] Gey, M. H., Chromatographie 1: LC - HPLC - UHPLC, in Instrumentelle Analytik und Bioanalytik, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2015, S. 123, ISBN: 978-3-662-46254-6.
- [101] Gey, M. H., Kopplungstechniken, in Instrumentelle Analytik und Bioanalytik, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2015, S. 371–372, ISBN: 978-3-662-46254-6.
- [102] Fenn, J., Mann, M., Meng, C., Wong, S., and Whitehouse, C., Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules, *Science*, vol. 246, no. 4926, pp. 64–71, Oct. 1989.
- [103] Gey, M. H., Massenspektrometrie, in Instrumentelle Analytik und Bioanalytik, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2015, S. 315–316, ISBN: 978-3-662-46254-6.
- [104] Gey, M. H., Massenspektrometrie, in Instrumentelle Analytik und Bioanalytik, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2015, S. 324–325, ISBN: 978-3-662-46254-6.
- [105] Gey, M. H., Massenspektrometrie, in Instrumentelle Analytik und Bioanalytik, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2015, S. 328, ISBN: 978-3-662-46254-6.
- [106] Böcker, J., Ionen-Chromatographie, in Chromatographie: instrumentelle Analytik mit Chromatographie und Kapillarelektrophorese, Vogel, 1997, S. 317–318, ISBN: 3-8023-1582-0.
- [107] Böcker, J., Ionen-Chromatographie, in Chromatographie: instrumentelle Analytik mit Chromatographie und Kapillarelektrophorese, Vogel, 1997, S. 325, ISBN: 3-8023-1582-0.
- [108] Böcker, J., Ionen-Chromatographie, in Chromatographie: instrumentelle Analytik mit Chromatographie und Kapillarelektrophorese, 1997, S. 336–337, ISBN: 3-8023-1582-0.
- [109] Böcker, J., Ionen-Chromatographie, in Chromatographie: instrumentelle Analytik mit Chromatographie und Kapillarelektrophorese, 1997, S. 337–339, ISBN: 3-8023-1582-0.
- [110] Böcker, J., Ionen-Chromatographie, in Chromatographie: instrumentelle Analytik mit Chromatographie und Kapillarelektrophorese, Vogel, 1997, S. 323–326, ISBN: 3-8023-1582-0.
- [111] Bustamante, J., Navarro, P., Arana, G., de Diego, A., and Madariaga, J. M., Ultrasound assisted dialysis of semi-permeable membrane devices for the simultaneous analysis of a wide number of persistent organic pollutants, *Talanta*, vol. 114, pp. 32–7, Sep. 2013.
- [112] van't Hoff, J. H., The role of osmotic pressure in the analogy between solutions and gases, *J. Memb. Sci.*, vol. 100, no. 1, pp. 39–44, 1995.
- [113] TRACE Analytics GmbH,[Online] Verfügbar: [www.trace.de](http://www.trace.de), [Zugriff: 24.07.2017].
- [114] van't Hoff, J. H., The role of osmotic pressure in the analogy between solution and gases, *Zeitschrift für Phys. Chemie*, Ver. 1, S. 481–508, 1887.

- [115] Kromidas, S., Validierung in der Analytik. Wiley-VCH, Weinheim, 2011, ISBN: 978-3-527-32939-7.
- [116] ICH, Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: *Text and Methodology*, ICH Harmonised, Tripartite Guideline, vol. 4, p. 17, Nov. 2005.
- [117] Rassow, J., Enzymkinetik, in Biochemie, *Duale Reihe Biochemie*, Thieme, Stuttgart, S. 27–35, 2008, ISBN: 978-3-13-125354-5
- [118] Deutsches Institute für Normung, DIN 38412, 1994.
- [119] Deutsches Institut für Normung, DIN 38 414, Teil 8, 1985.
- [120] Raposo, F., Fernández-Cegri, V., and Borja, R., Control of VFAs in anaerobic reactors: Is it an easy task? What do we know about off-line analytical performance?, [Conference] *13<sup>th</sup> World Congress on Anaerobic Digestion*, 25-28.06.2013, Santiago de Compostela, Spain, 2013.
- [121] Schäfer, M., Drayß, M., Springer, A., Zacharias, P., and Meerholz, K., Radical cations in electrospray mass spectrometry: Formation of open-shell species, examination of the fragmentation behaviour in ESI-MS<sup>n</sup> and reaction mechanism studies by detection of transient radical cations, *European J. Org. Chem.*, vol. 2007, no. 31, pp. 5162–5174, Nov. 2007.
- [122] Hvattum, E. and Ekeberg, D., Study of the collision-induced radical cleavage of flavonoid glycosides using negative electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.*, vol. 38, no. 1, pp. 43–49, Jan. 2003.
- [123] Ferrer, I. and Furlong, E. T., Identification of alkyl dimethylbenzylammonium surfactants in water samples by solid-phase extraction followed by ion trap LC/MS and LC/MS/MS, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 35, no. 12, pp. 2583–2588, Jun. 2001.
- [124] Katritzky, A. R., Ramsden, C. A., Joule, J. A., and Zhdankin, V. V, Structure of Five-Membered Rings with One Heteroatom, *Handbook of Heterocyclic Chemistry*, Elsevier Science, Amsterdam, p. 212, 2010, ISBN: 978-0-080-95843-9.
- [125] Marcus, R. a., Spiers Memorial Lecture: Interplay of theory and computation in chemistry—examples from on-water organic catalysis, enzyme catalysis, and single-molecule fluctuations, *Faraday Discuss.*, vol. 145, p. 9, 2010.
- [126] Taylor, P. J., Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry, *Clin. Biochem.*, vol. 38, no. 4, pp. 328-334, Jan. 2005.
- [127] Stokvis, E., Rosing, H., and Beijnen, J. H., Stable isotopically labeled internal standards in quantitative bioanalysis using liquid chromatography/mass spectrometry: Necessity or not?, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 19, no. 3, pp. 401–407, Nov. 2005.
- [128] Annesley, T. M., Ion Suppression in Mass Spectrometry, *Clinic. Chem.*, vol.49, no. 7, pp. 1041-1044, Jul. 2003.
- [129] Khalil, E. F., Whitmore, T. N., Gamal-El-Din, H., El-Bassel, A., and Lloyd, D., The effects of pesticides on anaerobic digestion processes, *Environ. Technol.*, vol. 12, no. 6, pp. 471–475, Jun. 1991.

- [130] Khalil, E. and Whitmore, T., The effect of detergents on anaerobic digestion, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 29, pp. 517-522, Nov. 1988.
- [131] Tezel, U., Pierson, J. A., and Pavlostathis, S. G., Fate and effect of quaternary ammonium compounds on a mixed methanogenic culture, *Water Res.*, vol. 40, no. 19, pp. 3660–3668, Nov. 2006.
- [132] Gans, O., Determination of selected veterinary antibiotics and quaternary ammonium compounds in digestates of biogas plants in Austria Quaternary Ammonium Compounds (QAC), [Conference] *CODIS*, 27-29.02.2008, Solothurn, 2008.
- [133] Gerba, C. P., Quaternary Ammonium Biocides: Efficacy in Application, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 81, no. 2, pp. 464–469, Jan. 2015.
- [134] Eckard, A., Muthukumarappan, K., and Gibbons, W., A Review of the Role of Amphiphiles in Biomass to Ethanol Conversion, *Appl. Sci.*, vol. 3, no. 2, pp. 396–419, Apr. 2013.
- [135] Zhang, C. et al., Quaternary ammonium compounds (QACs): A review on occurrence, fate and toxicity in the environment, *Sci. Total Environ.*, vol. 518–519, pp. 352–362, Jun. 2015.
- [136] Games, L. M., King, J. E., and Larson, R. J., Fate and Distribution of a Quaternary Ammonium Surfactant, Octadecyltrimethylammonium Chloride (OTAC), in Wastewater Treatment, *Environ. Sci. Technol.* Vol. 16, no. 2, pp. 483–488, Aug. 1982.
- [137] Clara, M., Scharf, S., Scheffknecht, C., and Gans, O., Occurrence of selected surfactants in untreated and treated sewage, *Water Res.*, vol. 41, no. 19, pp. 4339–4348, Nov. 2007.
- [138] Ismail, Z. Z., Tezel, U., and Pavlostathis, S. G., Sorption of quaternary ammonium compounds to municipal sludge, *Water Res.*, vol. 44, no. 7, pp. 2303–2313, Apr. 2010.
- [139] Sütterlin, H., Alexy, R., and Kümmerer, K., The toxicity of the quaternary ammonium compound benzalkonium chloride alone and in mixtures with other anionic compounds to bacteria in test systems with *Vibrio fischeri* and *Pseudomonas putida*., *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 71, no. 2, pp. 498–505, Oct. 2008.
- [140] Eriksson, T., Börjesson, J., and Tjerneld, F., Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose, *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 31, pp. 353–364, Aug. 2002.
- [141] Merianos, J. J., Surface-Active Agents, in *Disinfection, Sterilization, and Preservation*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 287, 2001, ISBN: 9780683307405

## Anhang

a) 13. Liste der DVG [46]:

**13. Liste der nach den Richtlinien der DVG (4. Auflage sowie 3. Auflage für Übergangszeit) geprüften und als wirksam befundenen Desinfektionsmittel für den Tierhaltungsbereich (Handelspräparate)**

Stand: 23. Dezember 2016

*Diese Liste mit dem angegebenen Datum ist die einzige gültige Liste DVG-gelisteter Desinfektionsmittel für den Tierhaltungsbereich. Eine Berufung auf Eintragung eines Präparates in frühere Listen ist nicht statthaft.*

Für eine wirksame Desinfektion ist im Regelfall der Einsatz von 0,4 l Gebrauchslösung pro m² Oberfläche notwendig					Gebrauchskonzentration in Volumen-Prozent (V-%) bzw. g/100ml											
Produkt-Name	Hersteller/ *Vertreiber	Wirkstoffe	Temperatur °C	Einwirkzeit min	Bakterizidie				Leuorozidie Fungizidie		Viruzidie		Anti-parasitäre Wirkung		Spezielle Anwendung zwecke	
					Spezielle Desinfektion¹	vorbeugende Desinfektion²	Mykobakterien (Tuberkulozidie)	Bakterielle Sporen (Sporeizidie)	Hefepilze (Leuorozidie)³	Hefepilze und Schimmelpilze⁴ (Fungizidie)	Unbehüllte Viren (Viruzidie)⁵	Behüllte Viren (begrenzte Viruzidie)⁶	Parasitäre Würmer (Wurmer)⁷	Parasitäre Einzeller⁸	Erregerart	Konzentrationen
1	2	3			4a	4b	5a	5b	6a	6b	7a	7b	8a	8b	9a	9b
ACIDES	*CID LINES NV/SA Waterpoortstraat 2 B-8900 Ieper BELGIEN	Peroxidverbindungen, organ. Säuren, oberflächen-aktive Substanzen	10	30												
				60												
				120												
			20	30		1,0						1,0				
				60	2,0				2,0		1,0					
				120												
Aci-nova® #	KESLAPHARMA WOLFEN GMBH Keslastr. 1 D-06803 Bitterfeld-Wolfen	Peressigsäure	10	30	0,75	0,5										
				60	0,5	0,5										
				120	0,5	0,25										
			20	30							0,75	0,5				
				60							0,5	0,25				
				120							0,25	0,25				
AGACID AKTIV	*Anti-Germ Deutschland GmbH Oberbrühlstr. 16-18, D-87700 Memmingen	Peressigsäure Wasserstoff-peroxid	10	30												
				60												
				120												
			20	30												
				60	1,0	0,5			1,0		1,0	0,5				
				120												
AGACID FORTE	*Anti-Germ Deutschland GmbH Oberbrühlstr. 16-18, D-87700 Memmingen	Aldehyd, quat. Ammoniumverbindungen	10	30												
				60												
				120												
			20	30												
				60	2,0	0,5			2,0							
				120							2,0	0,5				
AGACID SUPER PLUS	*Anti-Germ Deutschland GmbH Oberbrühlstr. 16-18, D-87700 Memmingen	Aldehyde, quat. Ammoniumverbindungen	10	30												
				60												
				120												
			20	30												
				60		1,0			1,0							
				120	1,0						1,0	0,5				
ALDASAN 2000 #	Lysoform Dr. Hans Rosemann GmbH Kaiser-Wilhelm-Str. 133 D-12247 Berlin	Formaldehyd Glutaral	10	30									1,0			
				60								3,0	0,5			
				120								2,5				
			20	30												
				60												
				120												
ALDOVET SAN #	*Lysoform Vetfarm GmbH Kaiser-Wilhelm-Str. 133 D-12247 Berlin	Formaldehyd Glutaral	10	30									1,0			
				60								3,0	0,5			
				120								2,5				
			20	30												
				60												
				120												

Für eine wirksame Desinfektion ist im Regelfall der Einsatz von 0,4 l Gebrauchslösung pro m <sup>2</sup> Oberfläche notwendig					Gebrauchskonzentration in Volumen-Prozent (V-%) bzw. g/100ml												
Produkt-Name	Hersteller/ *Vertreiber	Wirkstoffe	Temperatur °C	Einwirkzeit min	Bakterizide				Levurozide Fungizide		Viruzide		Anti-parasitäre Wirkung		Spezielle Anwendungszwecke		
					Spezielle Desinfektion <sup>1</sup>	vorbeugende Desinfektion <sup>2</sup>	Mykobakterien (Tuberkulozide)	Bakterielle Sporen (Sporeizide)	Hefepilze (Levurozide) <sup>3</sup>	Hefepilze und Schimmelpilze <sup>4</sup> (Fungizide)	Unbehüllte Viren (Viruzide) <sup>5</sup>	Behüllte Viren (begrenzte Viruzide) <sup>6</sup>	Parasitäre Würmer (Wurmeier) <sup>7</sup>	Parasitäre Einzeller <sup>8</sup>	Erregerart	Konzentrationen	
1	2	3			4a	4b	5a	5b	6a	6b	7a	7b	8a	8b	9a	9b	
ALDOVET SUPER	Lysoform Vetfarm GmbH Kaiser-Wilhelm-Str. 133 D-12247 Berlin	Aldehyde, quat. Ammoniumverbindungen	10	30													
				60													
				120													
				20	30						2,5	0,5					
				60													
				120							1,0						
ALDOVET KOK #	Lysoform Vetfarm GmbH Kaiser-Wilhelm-Str. 133 D-12247 Berlin	Chlorkresol	10	30		1,0						1,5					
				60		0,75											
				120													
				20	30		0,75										
				60													
				120		0,5							2,5	2,5			
Agrosept	* GEA Farm Technologies GmbH Siemensstr. 25-27 D-59199 Bönen	Quat. Ammoniumverbindungen, Aldehyde	10	30													
				60													
				120													
				20	30												
				60		1,0					1,0						
				120	3,0				6,0		2,0						
Aldecoc CMK	EWABO Chemikalien GmbH & Co. KG Kolpingstraße 4 D-49835 Wietmarschen	p-chlor-m-kresol	10	30													
				60													
				120													
				20	30												
				60													
				120									3,0	3,0			
ALDEKOL DES* 03	EWABO Chemikalien GmbH & Co. KG Kolpingstraße 4 D-49835 Wietmarschen	Aldehyde	10	30													
				60													
				120													
				20	30						1,0						
				60		0,5			1,0		1,0						
				120	1,0												
ALDEKOL DES* 04	EWABO Chemikalien GmbH & Co. KG Kolpingstraße 4 D-49835 Wietmarschen	Aldehyde, quat. Ammoniumverbindungen	10	30													
				60													
				120													
				20	30		1,0										
				60													
				120	2,0				2,0		2,0	0,5					
ALDEKOL DES* AKTIV	EWABO Chemikalien GmbH & Co. KG Kolpingstraße 4 D-49835 Wietmarschen	Peressigsäure	10	30													
				60													
				120													
				20	30							0,5					
				60	1,0	0,5			1,0		1,0						
				120													
Antisept 99	*Ernst GmbH & Co. KG Hemsack 37 B D-59174 Kamen	Quat. Ammoniumverbindungen, Aldehyde	10	30													
				60													
				120													
				20	30												
				60		1,0					1,0						
				120	3,0				6,0		2,0						
ARVO BVF	QUARON S.A. 3, rue de la Buhotiere F-35136 St. Jacques de la Lande FRANKREICH	Glutaraldehyd, quat. Ammoniumverbindungen	10	30													
				60													
				120													
				20	30												
				60		0,5											
				120	3,0				3,0		3,0	1,0					

Für eine wirksame Desinfektion ist im Regelfall der Einsatz von 0,4 l Gebrauchslösung pro m <sup>2</sup> Oberfläche notwendig					Gebrauchskonzentration in Volumen-Prozent (V-%) bzw. g/100ml												
Produkt- Name	Hersteller/ *Vertreiber	Wirkstoffe	Temperatur °C	Einwirkzeit min	Bakterizidie				Levurozidie Fungizidie		Viruzidie		Anti- parasitäre Wirkung		Spezielle Anwendungs- zwecke		
					Spezielle Desinfektion <sup>1</sup>	Vorbereitende Desinfektion <sup>2</sup>	Mykobakterien (Tuberkuloidie)	Bakterielle Sporen (Sporizidie)	Hefepilze (Levurozidie) <sup>3</sup>	Hefepilze und Schimmelpilze <sup>4</sup> (Fungizidie)	Unbehüllte Viren (Viruzidie) <sup>5</sup>	Behüllte Viren (begrenzte Viruzidie) <sup>6</sup>	Parasitäre Würmer (Wurmizidie) <sup>7</sup>	Parasitäre Einzeller <sup>8</sup>	Erregerart	Konzentrationen	
1	2	3			4a	4b	5a	5b	6a	6b	7a	7b	8a	8b	9a	9b	
ARVOXANE	*QUARON S.A. 3, rue de la Buhotiere F-35136 St. Jacques de la Lande FRANKREICH	Peroxidver- bindungen, organ. Säuren, oberflächen- aktive Substanzen	10	30													
				60													
				120													
			20	30		1,0						1,0					
				60	2,0				2,0		1,0						
				120													
Ascarosteril AB 2-Komponenten- Produkt Komponente A + Komponente B	KESLA PHARMA WOLFEN GMBH Kesslastr. 1 D-06803 Bitterfeld- Wolfen	o-Hydroxy- diphenyl- Fettsäure- Eutektikum, Peressigsäure	10	30													
				60													
				120													
			20	30	1,0 A + 0,5 B	0,5 A + 0,25 B	2,0 A + 1,0 B		1,0 A + 0,5 B		2,0 A + 1,0 B	1,0 A + 0,5 B					
				60								0,5 A + 0,25 B					
				120			1,0 A + 0,5 B				1,0 A + 0,5 B		2,0 A + 1,0 B	3,0 A + 1,5 B			
BEG Top Des*	BEG Schulze Bremer GmbH Weite 6, D-48249 Dülmen-Rorup	Aldehyd, quat. Ammonium- verbindun- gen	10	30													
				60													
				120													
			20	30													
				60	2,0	0,5			2,0								
				120							2,0	0,5					
BEG EndoKok #	* BEG Schulze Bremer GmbH Weite 6, D-48249 Dülmen-Rorup	Chlorkresol	10	30		1,0						1,5					
				60		0,75											
				120													
			20	30		0,75											
				60													
				120		0,5							2,5	2,5			
BERGODES komplett	* Bergophor Futtermittelfab- rik Dr. Berger GmbH Kronacher Str. 13 D-95326 Kulmbach	Kresole	10	30													
				60													
				120													
			20	30													
				60													
				120		2,0	6,0				2,0	2,0	4,0				
BERGODES plus	* Bergophor Futtermittelfabrik Dr. Berger GmbH Kronacher Str. 13 D-95326 Kulmbach	Aldehyde	10	30													
				60													
				120													
			20	30													
				60		1,0				2,0	1,0						
				120	1,0				1,0		1,0						
BERGO OxyDes	* Bergophor Futtermittelfabrik Dr. Berger GmbH Kronacher Str. 13 D-95326 Kulmbach	Peressigsäure Wasserstoff- peroxid	10	30													
				60													
				120													
			20	30													
				60	1,0	0,5			1,0		1,0	0,5					
				120													
calgonit DS 680	Calvatis GmbH Dr. Albert- Reimann-Str. 2 D-68526 Ladenburg	Quat. Ammonium- verbindun- gen, Aldehyde	10	30													
				60													
				120													
			20	30													
				60		1,0											
				120					3,5								



Für eine wirksame Desinfektion ist im Regelfall der Einsatz von 0,4 l Gebrauchslösung pro m² Oberfläche notwendig					Gebrauchskonzentration in Volumen-Prozent (V-%) bzw. g/100ml											
Produkt-Name	Hersteller/ *Vertreiber	Wirkstoffe	Temperatur °C	Einwirkzeit min	Bakterizide				Levurozide Fungizide		Viruzide		Anti- parasitäre Wirkung		Spezielle Anwendungs- zwecke	
					Spezielle Desinfektion¹	Vorbeugende Desinfektion²	Mycobakterien (Tuberkulozide)	Bakterielle Sporen (Sporeizide)	Hefepilze (Levurozide)³	Hefepilze und Schimmelpilze⁴ (Fungizide)	Unbehüllte Viren (Viruzide)⁵	Behüllte Viren (begrenzte Viruzide)⁶	Parasitäre Würmer (Wurmeier)⁷	Parasitäre Einzeller⁸	Erregerart	Konzentrationen
1	2	3			4a	4b	5a	5b	6a	6b	7a	7b	8a	8b	9a	9b
calgonit sterizid forte 15	Calvatis GmbH Dr. Albert-Reimann- Str. 2 D-68526 Ladenburg	Peressigsäure	10	30												
				60												
				120												
			20	30					0,75							
				60	1,0	0,5			0,5		0,5	0,2				
				120												
calgonit sterizid Kokzi PRO	*Calvatis GmbH Dr. Albert-Reimann- Str. 2 D-68526 Ladenburg	Kresole	10	30												
				60												
				120												
			20	30												
				60												
				120									2,0	4,0		
calgonit sterizid P1 PRO	*Calvatis GmbH Dr. Albert-Reimann- Str. 2 D-68526 Ladenburg	Aldehyde	10	30												
				60												
				120												
			20	30												
				60		0,5						1,0				
				120	1,0				1,0		1,0					
D 50	* CID LINES NV/SA Waterpoortstraat 2 B-8900 Ieper BELGIEN	Peroxidverbin- dungen, org. Säuren, oberflächen- aktive Substanzen	10	30												
				60												
				120												
			20	30		1,0						1,0				
				60	2,0				2,0		1,0					
				120												
DESINTEC® FL- coc garant	* AGRAVIS Raiffeisen AG Industrieweg 110 D-48155 Münster	p-chlor-m- kresol	10	30												
				60												
				120												
			20	30												
				60												
				120									3,0	3,0		
DESINTEC® FL- des	* AGRAVIS Raiffeisen AG Industrieweg 110 D-48155 Münster	Aldehyde	10	30												
				60												
				120												
			20	30								1,0				
				60		0,5			1,0		1,0					
				120	1,0											
DESINTEC® FL- des ALLROUND	* AGRAVIS Raiffeisen AG Industrieweg 110 D-48155 Münster	o-Hydroxy- diphenyl- Fettsäure- Eutektikum Peressigsäure	10	30												
				60												
				120												
			20	30	1,0 A + 0,5 B	0,5 A + 0,25 B	2,0 A + 1,0 B		1,0 A + 0,5 B		2,0 A + 1,0 B	1,0 A + 0,5 B				
				60								0,5 A + 0,25 B				
				120			1,0 A + 0,5 B				1,0 A + 0,5 B		2,0 A + 1,0 B	3,0 A + 1,5 B		
DESINTEC® FL-des GA forte	* AGRAVIS Raiffeisen AG Industrieweg 110 D-48155 Münster	Aldehyde, quat. Ammonium- verbindun- gen	10	30												
				60												
				120												
			20	30		1,0										
				60												
				120	2,0				2,0		2,0	0,5				
DESINTEC® Perox Liquid	* AGRAVIS Raiffeisen AG Industrieweg 110 D-48155 Münster	Peressigsäure	10	30	0,75	0,5										
				60	0,5	0,5										
				120	0,5	0,25										
			20	30							0,75	0,5				
				60							0,5	0,25				
				120							0,25	0,25				
#																

Für eine wirksame Desinfektion ist im Regelfall der Einsatz von 0,4 l Gebrauchslösung pro m² Oberfläche notwendig					Gebrauchskonzentration in Volumen-Prozent (V-%) bzw. g/100ml												
Produkt- Name	Hersteller/ *Vertreiber	Wirkstoffe	Temperatur °C	Einwirkzeit min	Bakterizide				Levuroozide Fungizide		Viruzide		Anti- parasitäre Wirkung		Spezielle Anwendung zwecke		
					Spezielle Desinfektion¹	vorbereitende Desinfektion²	Mykobakterien (Tuberkulozide)	Bakterielle Sporen (Sporizide)	Hefepilze (Levuroozide)³	Hefepilze und Schimmelpilze⁴ (Fungizide)	Unbehüllte Viren (Viruzide)⁵	Behüllte Viren (begrenzte Viruzide)⁶	Parasitäre Würmer (Wurmizer)⁷	Parasitäre Einzeller⁸	Erregerart	Konzentrationen	
1	2	3			4a	4b	5a	5b	6a	6b	7a	7b	8a	8b	9a	9b	
Disinfect forte	* Arthur Schopf Hygiene GmbH & Co. KG Pfaffensteinstr. 1 D-83115 Neubuurn	Aldehyde, quat. Ammonium- verbindungen	10	30													
				60													
				120													
			20	30		1,0											
				60													
				120	2,0				2,0		2,0	0,5					
Disinfect premium	* Arthur Schopf Hygiene GmbH & Co. KG Pfaffensteinstr. 1 D-83115 Neubuurn	Aldehyde	10	30													
				60													
				120													
			20	30								1,0					
				60		0,5			1,0		1,0						
				120	1,0												
ECOCID® Advanced  #	KRKA d.d. Smarjeska cesta 6 SI-8501 Novo mesto SLOWENIEN	Perborsäure, organ. Säuren	10	30	1,5	0,5			0,5								
				60	1,0												
				120													
			20	30							1,5	1,0					
				60							0,5	0,5					
				120													
ECOCID® S	KRKA d.d. Smarjeska cesta 6 SI-8501 Novo mesto SLOWENIEN	Peroxidver- bindungen, oberflächen- akt. Substanzen, org. Säuren	10	30													
				60													
				120													
			20	30													
				60	5,0	2,0			5,0			2,0					
				120							3,0	1,0					
ENDOSAN FORTE S NEU	*H. Wilhelm Schaumann Postfach 20 62 D-25410 Pinneberg	Kresole	10	30													
				60													
				120													
			20	30													
				60													
				120		2,0	6,0					2,0	2,0	4,0			
Erve Ultracid	* ERVE Deutschland GmbH Kerkhagen 20 D-58513 Lüdenscheid	Quat. Ammonium- verbindungen, Aldehyde	10	30													
				60													
				120													
			20	30													
				60		1,0						1,0					
				120	3,0				6,0		2,0						
FINK - Antisept T	FINKTEC GmbH Gewerbepark 16 D-59069 Hamm	Quat. Ammonium- verbindungen, Aldehyde	10	30													
				60													
				120													
			20	30													
				60		1,0						1,0					
				120	3,0				6,0		2,0						
GERMICIDAN® APA	Anti-Germ Deutschland GmbH Oberbrühlstr. 16-18 D-87700 Memmingen	Peressigsäure Wasserstoff- peroxid	10	30													
				60													
				120													
			20	30													
				60	1,0	0,5			1,0		1,0	0,5					
				120													
GERMICIDAN® F1	Anti-Germ Deutschland GmbH Oberbrühlstr. 16-18 D-87700 Memmingen	Aldehyde, quat. Ammoniumv- erbindungen	10	30													
				60													
				120													
			20	30													
				60		1,0			1,0								
				120	1,0						1,0	0,5					

Für eine wirksame Desinfektion ist im Regelfall der Einsatz von 0,4 l Gebrauchslösung pro m² Oberfläche notwendig					Gebrauchskonzentration in Volumen-Prozent (V-%) bzw. g/100ml											
Produkt-Name	Hersteller/ *Vertreiber	Wirkstoffe	Temperatur °C	Einwirkzeit min	Bakterizide				Levurozide Fungizide		Viruzide		Anti-parasitäre Wirkung		Spezielle Anwendungszwecke	
					Spezielle Desinfektion¹	vorbeugende Desinfektion²	Mykobakterien (Tuberkulozide)	Bakterielle Sporen (Sporeizide)	Hefepilze (Levurozide)³	Hefepilze und Schimmelpilze⁴ (Fungizide)	Unbekannte Viren (Viruzide)⁵	Bekannte Viren (bekannte Viruzide)⁶	Parasitäre Würmer (Wurmeizer)⁷	Parasitäre Einzeller⁸	Erregerart	Konzentrationen
1	2	3			4a	4b	5a	5b	6a	6b	7a	7b	8a	8b	9a	9b
# Incimaxx DES-N	ECOLAB DEUTSCHLAND GMBH Ecolab-Allee 1, D-40789 Monheim am Rhein	Org. Säuren, Wasserstoff-peroxid, Peressigsäure	10	30	2,0	1,0				9,0						
				60	2,0	1,0				7,0						
				120	2,0	0,75				7,0						
			20	30							1,5	0,75				
				60							1,0	0,5				
				120												
INTERASK*	INTERHYGIENE GMBH Neufelder Str. 30 D-27472 Cuxhaven	Kresole	10	30												
				60												
				120												
			20	30												
				60												
				120									2,5			
INTERCID*	INTERHYGIENE GMBH Neufelder Str. 30 D-27472 Cuxhaven	Aldehyde	10	30												
				60												
				120												
			20	30												
				60		0,5						1,0				
				120	1,0				1,0		1,0					
INTERCID* N	INTERHYGIENE GMBH Neufelder Str. 30 D-27472 Cuxhaven	Aldehyde	10	30												
				60												
				120												
			20	30												
				60												
				120							2,0	1,0				
INTERKOKASK*	INTERHYGIENE GMBH Neufelder Str. 30 D-27472 Cuxhaven	Kresole	10	30												
				60												
				120												
			20	30												
				60												
				120									2,0	4,0		
INTERSTERIL*	INTERHYGIENE GMBH Neufelder Str. 30 D-27472 Cuxhaven	Peressigsäure Wasserstoff-peroxid	10	30												
				60												
				120												
			20	30								0,5				
				60								1,0				
				120								0,5				
2 K Desinfektion  Konzentrationsangaben beziehen sich auf a = Desinfekt K1 RM 790 und b = Desinfekt K2 RM 791 in der Gebrauchslösung	* Alfred Kärcher GmbH & Co. KG Alfred-Kärcher-Str. 28-40 D-71364 Winnenden	Peressigsäure alkalisiert auf pH 8,5 – 9,5 mit K2  Hinweis: Angaben des Herstellers zum Anmischen der Gebrauchslösungen sind zu befolgen	10	30												
				60												
				120												
			20	30		0,5a + 0,5b						0,5a + 0,5b				
				60		0,5a + 0,5b			0,5a + 0,5b		0,5a + 0,5b					
				120			1,0a + 1,0b									
KC 5000	CID LINES NV/SA Waterpoortstraat 2 B-8900 Ieper BELGIEN	Chlor-Methyl-Phenol, Alkohole	10	30												
				60												
				120												
			20	30												
				60												
				120										4,0		
Kokzi Des	* Arthur Schopf Hygiene GmbH & Co. KG Pfaffensteinstr. 1 D-83115 Neubuurn	p-chlor-m-kresol	10	30												
				60												
				120												
			20	30												
				60												
				120									3,0	3,0		

Für eine wirksame Desinfektion ist im Regelfall der Einsatz von 0,4 l Gebrauchslösung pro m² Oberfläche notwendig					Gebrauchskonzentration in Volumen-Prozent (V-%) bzw. g/100ml												
Produkt-Name	Hersteller/ *Vertreiber	Wirkstoffe	Temperatur °C	Einwirkzeit min	Bakterizidie				Levurozidie Fungizidie		Viruzidie		Anti- parasitäre Wirkung		Spezielle Anwendungszwecke		
					Spezielle Desinfektion¹	Vorbeugende Desinfektion²	Mykobakterien (Tuberkulizidie)	Bakterielle Sporen (Sporeizidie)	Hefepilze (Levurozidie)³	Hefepilze und Schimmelpilze⁴ (Fungizidie)	Unbehüllte Viren (Viruzidie)⁵	Behüllte Viren (begrenzte Viruzidie)⁶	Parasitäre Würmer (Wurmeier)⁷	Parasitäre Einzeller⁸	Erregerart	Konzentrationen	
1	2	3			4a	4b	5a	5b	6a	6b	7a	7b	8a	8b	9a	9b	
L-Vet N	Schülke & Mayr GmbH D-22840 Norderstedt	Aldehyde	10	30													
				60													
				120													
			20	30													
				60		1,0						1,0					
				120	1,0				1,0		1,0						
M&ENNO- VETERINÄR A	MENNO CHEMIE- VERTRIEB GmbH Langer Kamp 104 D-22850 Norderstedt	verschiedene Aldehyde	10	30													
				60													
				120													
			20	30								1,0					
				60					2,0								
				120	2,0	1,0			1,5		2,0						
M&ENNO- VETERINÄR B neu	MENNO CHEMIE- VERTRIEB GmbH Langer Kamp 104 D-22850 Norderstedt	Formaldehyd, Glutaraldehyd	10	30													
				60													
				120													
			20	30		1,0											
				60													
				120	1,0				1,0		1,0	0,5					
MS Megades D	* Schippers GmbH Kölner Str. 62 D-47647 Kerken	Aldehyde	10	30													
				60													
				120													
			20	30									0,5				
				60	1,0	1,0			1,0								
				120							2,0						
NEOPREDISAN 135-1	MENNO CHEMIE- VERTRIEB GmbH Langer Kamp 104 D-22850 Norderstedt	Kresole	10	30													
				60													
				120													
			20	30													
				60													
				120		2,0	6,0					2,0	2,0	4,0			
OPTISEPT*	Dr. Schumacher GmbH Am Roggenfeld 3 D-34323 Malsfeld	Quat. Ammonium- verbindungen, Aldehyde	10	30													
				60													
				120													
			20	30													
				60		1,0					1,0						
				120	3,0				6,0		2,0						
ORGANOSEPT NEU	*H. Wilhelm Schaumann Postfach 20 62 D-25410 Pinneberg	Organ. Säuren	10	30													
				60													
				120													
			20	30		1,0							1,0				
				60								1,0					
				120	1,0		5,0		1,0								
OXYSTRONG FG	Solvay Chemie b.v. Schepersweg 1 NL-6049 CV Roermond NIEDERLANDE	Peressigsäure Wasserstoff- peroxid	10	30													
				60													
				120													
			20	30					2,0								
				60	1,5	0,5											
				120													
PERMANENT NEU	*H. Wilhelm Schaumann Postfach 20 62 D-25410 Pinneberg	Aldehyde	10	30													
				60													
				120													
			20	30													
				60		1,0					2,0	1,0					
				120	1,0				1,0	1,0							

Für eine wirksame Desinfektion ist im Regelfall der Einsatz von 0,4 l Gebrauchslösung pro m² Oberfläche notwendig					Gebrauchskonzentration in Volumen-Prozent (V-%) bzw. g/100ml													
Produkt-Name	Hersteller/ *Vertreiber	Wirkstoffe	Temperatur °C	Einwirkzeit min	Bakterizidie				Levurocidie Fungizidie		Viruzidie		Anti- parasitäre Wirkung		Spezielle Anwendungs- zwecke			
					Spezielle Desinfektion¹	vorbeugende Desinfektion²	Mykobakterien (Tuberkulose)	Bakterielle Sporen (Sporeizidie)	Hefepilze (Levurocidie)³	Hefepilze und Schimmelpilze⁴ (Fungizidie)	Unbehüllte Viren (Viruzidie)⁵	Behüllte Viren (begrenzte Viruzidie)⁶	Parasitäre Würmer (Wurmizidie)⁷	Parasitäre Einzeller⁸	Erregerart	Konzentrationen		
1	2	3			4a	4b	5a	5b	6a	6b	7a	7b	8a	8b	9a	9b		
PERMANENT Aktiv	*H. Wilhelm Schaumann Postfach 20 62 D-25410 Pinneberg	Aldehyde	10	30														
				60														
				120														
			20	30														
				60		0,5						1,0						
				120	1,0				1,0		1,0							
Preventol CD 601	LANXESS Deutschland GmbH Chempark Gebäude Q18 D-51369 Leverkusen	Kresole, Glutar- dialdehyd	10	30														
				60														
				120														
			20	30														
				60		2,0							2,0					
				120									1,0					
PROXITANE® AHC	Solvay Chemie b.v. Schepersweg 1 NL-6049 CV Roermond NIEDERLANDE	Peroxidver- bindungen, org. Säuren, oberflächen- aktive Subst.	10	30														
				60														
				120														
			20	30		1,0						1,0						
				60	2,0				2,0		1,0							
				120														
ROTIE-CID®	* rotie-pharm GmbH & Co. KG Industriestr. 44 D-49082 Osnabrück	Aldehyde	10	30														
				60														
				120														
			20	30								1,0						
				60		0,5			1,0		1,0							
				120	1,0													
ROTIE-KOK total N®	* rotie-pharm GmbH & Co. KG Industriestr. 44 D-49082 Osnabrück	p-chlor-m- kresol	10	30														
				60														
				120														
			20	30														
				60														
				120										3,0	3,0			
ROTIE-PER®	* rotie-pharm GmbH & Co. KG Industriestr. 44 D-49082 Osnabrück	Peressigsäure	10	30														
				60														
				120														
			20	30								0,5						
				60	1,0	0,5			1,0		1,0							
				120														
Schopf Stall- Des®	*Arthur Schopf Hygiene GmbH & Co. KG Pflafersteinstr. 1 D-83115 Neubauern	Quat. Ammonium- verbindungen, Aldehyde	10	30														
				60														
				120														
			20	30														
				60		1,0						1,0						
				120	3,0				6,0		2,0							
Sorgene 5®	BASF SE D-67056 Ludwigshafen	Peroxidver- bindungen	10	30														
				60														
				120														
			20	30														
				60		0,5					2,0	1,0						
				120	1,0		4,5		1,0		1,0	0,5						
TH 5	Laboratoire SOGIVAL 200, avenue de Mayenne B.P. 2227 F-53022 Laval Cedex 9 FRANKREICH	Glutaraldehyd Quat. Ammonium- verbindungen	10	30														
				60														
				120														
			20	30		1,0												
				60								1,0						
				120	4,0				4,0		4,0							



Für eine wirksame Desinfektion ist im Regelfall der Einsatz von 0,4 l Gebrauchslösung pro m² Oberfläche notwendig					Gebrauchskonzentration in Volumen-Prozent (V-%) bzw. g/100ml												
Produkt-Name	Hersteller/ *Vertreiber	Wirkstoffe	Temperatur °C	Einwirkzeit min	Bakterizidie				Levurozidie Fungizidie		Viruzidie		Anti- parasitäre Wirkung		Spezielle Anwendungs- zwecke		
					Spezielle Desinfektion¹	vorbeugende Desinfektion²	Mykobakterien (Tuberkulozidie)	Bakterielle Sporen (Sporeizidie)	Hefepilze (Levurozidie)³	Hefepilze und Schimmelpilze⁴ (Fungizidie)	Unbehüllte Viren (Viruzidie)⁵	Behüllte Viren (begrenzte Viruzidie)⁶	Parasitäre Würmer (Wurmeier)⁷	Parasitäre Einzeller⁸	Erregerart	Konzentrationen	
1	2	3			4a	4b	5a	5b	6a	6b	7a	7b	8a	8b	9a	9b	
TOLO 660	BÜFA Reinigungssys- teme GmbH August-Hanken-Str. 30 D-26125 Oldenburg	Quat. Ammonium- verbindun- gen, Aldehyde	10	30													
				60													
				120													
			20	30													
				60		1,0						1,0					
				120	3,0				6,0		2,0						
VENNO-FF super	MENNO CHEMIE- VERTRIEB GmbH Langer Kamp 104 D-22850 Norderstedt	Aldehyde	10	30													
				60													
				120													
			20	30													
				60		1,0					2,0	1,0					
				120	1,0				1,0		1,0						
VENNO-Oxygen	MENNO CHEMIE- VERTRIEB GmbH Langer Kamp 104 D-22850 Norderstedt	Sauerstoff- abspalter	10	30													
				60													
				120													
			20	30								2,0					
				60		1,0											
				120	2,0				2,0		2,0						
VENNO-VET 1	MENNO CHEMIE- VERTRIEB GmbH Langer Kamp 104 D-22850 Norderstedt	Organ. Säuren, Alkohol, Tenside	10	30													
				60													
				120													
			20	30								1,0					
				60		1,0			1,0								
				120	2,0						1,0						
VENNO-VET 1 super	MENNO CHEMIE- VERTRIEB GmbH Langer Kamp 104 D-22850 Norderstedt	Organ. Säuren	10	30													
				60													
				120													
			20	30		1,0						1,0					
				60							1,0						
				120	1,0		5,0		1,0								
Virkon S	Antec International Ltd. Chilton Industrial Estate Sudbury Suffolk CO 10 2 XD ENGLAND	Peroxidver- bindungen, oberflächen- akt. Subst. org. Säuren	10	30													
				60													
				120													
			20	30													
				60		3,0					2,0	2,0					
				120								1,0					
VIROCID	CID LINES NV/SA Waterpoortstraat 2 B-8900 Ieper BELGIEN	Quat. Ammonium- verbindun- gen, Glutar- aldehyd	10	30													
				60													
				120													
			20	30													
				60		1,0						0,5					
				120	3,0				3,0		2,0						
VIROCID F	CID LINES NV/SA Waterpoortstraat 2 B-8900 Ieper BELGIEN	Quat. Ammonium- verbindun- gen, Glutar- aldehyd	10	30													
				60													
				120													
			20	30		1,0											
				60	2,0	0,5											
				120					2,0		2,0	1,0					
VIRODES	*CID LINES NV/SA Waterpoortstraat 2 B-8900 Ieper BELGIEN	Quat. Ammonium- verbindun- gen, Glutar- aldehyd	10	30													
				60													
				120													
			20	30													
				60		1,0						0,5					
				120	3,0				3,0		2,0						

Für eine wirksame Desinfektion ist im Regelfall der Einsatz von 0,4 l Gebrauchslösung pro m² Oberfläche notwendig					Gebrauchskonzentration in Volumen-Prozent (V-%) bzw. g/100ml													
Produkt-Name	Hersteller/ *Vertreiber	Wirkstoffe	Temperatur °C	Einwirkzeit min	Bakterizidie				Levurozidie Fungizidie		Viruzidie		Anti- parasitäre Wirkung		Spezielle Anwendungs- zwecke			
					Spezielle Desinfektion¹	Vorbeugende Desinfektion²	Mykobakterien (Tuberkulozidie)	Bakterielle Sporen (Sporizidie)	Hefepilze (Levurozidie)³	Hefepilze und Schimmelpilze⁴ (Fungizidie)	Unbehüllte Viren (Viruzidie)⁵	Behüllte Viren (begrenzte Viruzidie)⁶	Parasitäre Würmer (Wurmeier)⁷	Parasitäre Einzeller⁸	Erregerart	Konzentrationen		
1	2	3			4a	4b	5a	5b	6a	6b	7a	7b	8a	8b	9a	9b		
WKC 2500 #	* Wuttke und Schwarz GmbH Zimmerergasse 1, 88326 Aulendorf	Chlorkresol	10	30		1,0						1,5						
				60		0,75												
				120														
				20	30		0,75											
					60													
					120		0,5								2,5	2,5		
1+1 Wofasteril® SC super  Konzentrationsan- gaben beziehen sich auf W = Wofasteril® SC super und a = alcapur in der Gebrauchslösung	KESLA PHARMA WOLFEN GMBH Keslastr. 1 D-06803 Bitterfeld- Wolfen	Peressigsäure alkalisiert auf pH 8,5 – 9,5 mit alcapur  <u>Hinweis:</u> Angaben des Herstellers zum Anmischen der Gebrauchslösun- gen sind zu befolgen	10	30														
				60														
				120														
				20	30		0,5W + 0,5a					0,5W + 0,5a						
					60	0,5W + 0,5a				0,5W + 0,5a		0,5W + 0,5a						
					120			1,0W + 1,0a										

# Handelspräparat geprüft nach EN-Prüfnormen und nach aktuellen DVG-Prüfrichtlinien (4. Auflage)

<sup>1</sup> Spalte 4a: "Spezielle Desinfektion"

Gezielte Maßnahmen gegen bestimmte Erreger bakterieller Infektionskrankheiten mit Ausnahme von Mykobakterien (siehe unter Tuberkulozidie) und Bakteriensporen (siehe unter Sporizidie, derzeit nicht belegt). I.d.R. in unbelegten Stallungen.

<sup>2</sup> Spalte 4b: "Vorbeugende Desinfektion"

Hygienische Maßnahme zur allgemeinen Verminderung des Bakteriengehaltes in belegten und unbelegten Stallungen (z. B. Hygiene-Programm).

<sup>3</sup> Spalte 6a: "Levurozid"

Breites Wirkungsspektrum gegen Hefepilze.

<sup>4</sup> Spalte 6b: "Fungizid"

Breites Wirkungsspektrum gegen Hefepilze, Haut- und Schimmelpilze.

<sup>5</sup> Spalte 7a: "Viruzid"

Wirksam gegen unbehüllte und behüllte Viren (siehe Tab. 1 und 2)

<sup>6</sup> Spalte 7b: "Begrenzt viruzid"

Nur wirksam gegen Viren mit Hülle (siehe Tab. 2)

<sup>7</sup> Spalte 8a: "Parasitäre Würmer"

Wirksam gegen Wurmeier (Prüforganismus *Ascaris suum*, Schweinespulwurm)  
Aufgrund der hohen Widerstandsfähigkeit (Tenazität) dieses Testorganismus ist eine entsprechende Wirksamkeit auf Umweltstadien (Eier, Larven) aller parasitischen Rundwürmer anzunehmen.

<sup>8</sup> Spalte 8b: "Parasitäre Einzeller"

Wirksam gegen parasitäre Einzeller (Prüforganismus *Eimeria tenella*, Erreger der Hühnerkokzidiose)  
Aufgrund der hohen Widerstandsfähigkeit (Tenazität) dieses Testorganismus ist eine entsprechende Wirksamkeit auf alle Umweltstadien (Oozysten, Zysten) von Kokzidien sowie Kryptosporidien und Giardien anzunehmen.

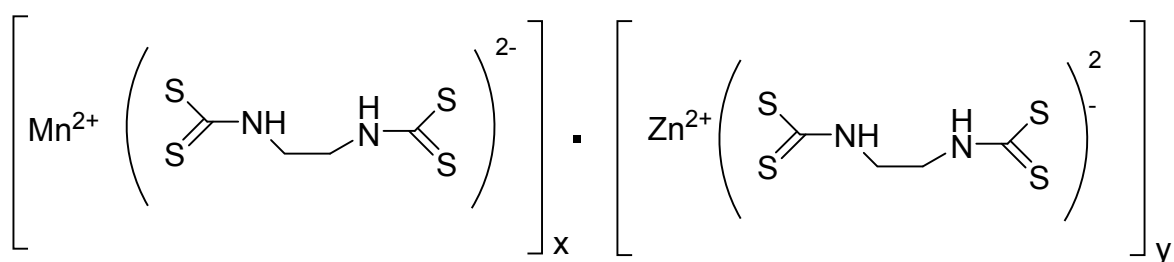
Hinweise:

Präparate auf der Basis von Aktivchlor bzw. Natriumhypochlorit:

Die Begutachtung für den Listeneintrag bezieht sich auf einen Mindestgehalt von Aktivchlor, der vom Hersteller / \*Vertreiber zu erfragen ist.

Bei einer Abweichung des Aktivchlorgehaltes unter den angegebenen Wert gilt die Anwendungsempfehlung der DVG nicht mehr.

## b) Mancozeb

CAS: 8018-01-7, M=541,07 g·mol<sup>-1</sup>,

## c) T-Werttabelle

**t-Verteilung**

In der Tabelle finden sich die kritischen t-Werte. Das Signifikanzniveau wird durch die Fläche angegeben. Beim einseitigen Testen auf dem 5%-Niveau beträgt die relevante Fläche 0,95; beim zweiseitigen Testen entsprechend 0,975. Der empirische t-Wert muss gleich groß oder größer sein als der kritische t-Wert aus der Tabelle, um auf dem entsprechenden Niveau signifikant zu sein.

df	Fläche						
	0,8	0,85	0,9	0,95	0,975	0,99	0,995
1	1,377	1,964	3,078	6,314	12,706	31,821	63,657
2	1,001	1,386	1,886	2,92	4,303	6,965	9,925
3	0,978	1,25	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841
4	0,941	1,19	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604
5	0,92	1,156	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032
6	0,906	1,134	1,44	1,943	2,447	3,143	3,707
7	0,896	1,119	1,415	1,895	2,305	2,998	3,5
8	0,889	1,108	1,397	1,86	2,306	2,896	3,355
9	0,883	1,1	1,383	1,833	2,262	2,821	3,25
10	0,879	1,093	1,372	1,813	2,228	2,764	3,169
11	0,876	1,088	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106
12	0,873	1,083	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055
13	0,87	1,079	1,35	1,771	2,16	2,651	3,012
14	0,868	1,076	1,345	1,761	2,145	2,625	2,977
15	0,866	1,074	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947
16	0,865	1,071	1,337	1,746	2,12	2,584	2,921
17	0,863	1,069	1,333	1,74	2,11	2,567	2,898
18	0,862	1,067	1,33	1,734	2,101	2,552	2,878
19	0,861	1,066	1,328	1,729	2,093	2,54	2,861
20	0,86	1,064	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845
21	0,859	1,063	1,323	1,721	2,08	2,518	2,831
22	0,858	1,061	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819
23	0,858	1,06	1,319	1,714	2,069	2,5	2,807
24	0,857	1,059	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797
25	0,856	1,058	1,316	1,708	2,06	2,485	2,787
26	0,856	1,058	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779
27	0,855	1,057	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771
28	0,855	1,056	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763
29	0,854	1,055	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756
30	0,854	1,055	1,31	1,697	2,042	2,459	2,75
40	0,851	1,05	1,303	1,684	2,021	2,423	2,705
60	0,848	1,046	1,296	1,071	1,997	2,39	2,86
120	0,845	1,041	1,289	1,658	1,98	2,358	2,617
∞	0,843	1,039	1,282	1,645	1,96	2,326	2,576

## d)

[Online] Verfügbar:

[http://www.springer.com/cda/content/document/cda\\_downloadaddocument/w\\_17\\_4536.pdf?SGWID=0-0-45-1361184-p174297125](http://www.springer.com/cda/content/document/cda_downloadaddocument/w_17_4536.pdf?SGWID=0-0-45-1361184-p174297125), [Zugriff, 25.07.2017]